



Raquel Santiago Serra

Estudante de Engenharia Química e Bioquímica

Desenvolvimento e Simulação de um Processo para a Purificação de Peptídeos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: José Paulo Barbosa Mota, Professor Catedrático,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Tiago Pereira dos Santos, Mestre,
Universidade Nova de Lisboa

Júri

Presidente: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Dr. Ricardo J S Silva
Vogal: Prof. Dr. José Paulo Barbosa Mota



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2019

Desenvolvimento e Simulação de um processo para a Purificação de Peptídeos

Copyright © Raquel Santiago Serra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

The book of nature is written in the language of mathematics.
Galileu Galilei

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostava de agradecer ao Prof. José Paulo Mota, pelo conhecimento que forneceu em becos que pareciam não ter saída e pelas sugestões relevantes que foi apresentando ao longo do trabalho. Seguidamente, gostava de deixar um agradecimento especial ao Tiago Santos, que acompanhou e orientou o meu trabalho e que considero ter sido uma enorme ajuda e também um grande amigo e companhia ao longo desta fase.

A todo o grupo com quem partilhei gabinete, laboratório, dúvidas, conhecimentos e sorrisos. Em especial à Abimaelle que me ajudou imenso com a parte escrita e que também foi uma grande companhia, em termos pessoais.

Depois dos agradecimentos às pessoas que acompanharam o trabalho desenvolvido na presente tese tenho de deixar uma mensagem com o mais puro dos obrigados às minhas colegas Ana e Filipa que me acompanharam em todas as vertentes desta etapa universitária, Obrigada. Como é óbvio também não posso deixar de agradecer a todas as pessoas com quem partilhei sorrisos e experiências ao longo destes anos de Faculdade.

Por último quero agradecer à minha família com especial destaque para os meus pais, os meus avós e o meu irmão que ajudaram a construir a minha personalidade e todo o conhecimento de foro pessoal. Os meus pais que, como é óbvio, forneceram-me os meios necessários para chegar até ao dia de hoje e por todo o carinho que revelam ter por mim. O meu irmão que apesar de tudo foi uma fonte de inspiração.

Por fim gostaria de deixar uma nota especial a meu avô que embora não esteja entre nós, viu-me começar esta etapa e sempre manteve o bom humor apesar das adversidades que lhe iam aparecendo.

RESUMO

Atualmente, o mercado de peptídeos farmacêuticos está em crescimento, sendo que em 2016 o volume mundial de vendas foi de cerca de 20 mil milhões de euros. Os peptídeos são biomoléculas constituídas por cadeias de aminoácidos e são utilizadas, maioritariamente, em terapias de reposição hormonal e oncológica.

A via utilizada a nível industrial para a obtenção de peptídeos sintéticos é a síntese em fase sólida. Este processo origina uma mistura líquida que contém não só o peptídeo alvo, mas também quantidades residuais de reagentes e compostos indesejados associados à síntese incompleta. Por este motivo, é necessário purificar de forma eficaz a mistura resultante, uma vez que o composto-alvo é utilizado como fármaco e a pureza requerida pelas agências farmacêuticas de controlo de qualidade, tal como a FDA, é elevada.

Atualmente o processo de purificação de péptidos mais utilizado a nível industrial é a cromatografia líquida em fase reversa. Tradicionalmente, a purificação cromatográfica de peptídeos é realizada em modo descontínuo monocoluna, apesar do baixo rendimento. Por este motivo, tem surgido investigação com o objetivo de mudar o *modus operandi* da cromatografia de descontínuo para contínuo, que se sabe ser mais eficiente. Resultados preliminares mostraram que em modo descontínuo monocoluna o rendimento obtido é cerca de 50%, enquanto que em modo multicoluna contínuo ronda os 95%.

O objetivo do presente trabalho consistiu na aplicação do princípio da cromatografia em contínuo à separação de misturas de peptídeos. Tendo em conta a novidade do trabalho foi necessário realizar uma vasta revisão bibliográfica das soluções já existentes. Reconstruiu-se e expandiu-se uma instalação experimental de cromatografia preparativa contínua com três colunas e desenvolveu-se um modelo de simulação da unidade. Este modelo foi aplicado a um caso de estudo de aplicação do processo GSSR (Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário). Foram ainda efetuadas experiências para a caracterização das colunas utilizadas no sistema e as isotérmicas dos compostos, passíveis de serem utilizados aquando da validação experimental do sistema.

Palavras-chave: Separação de peptídeos, Cromatografia em contínuo, Simulação de processos, GSSR

ABSTRACT

Currently, the pharmaceutical peptides market is growing, and in 2016, the world sales volume was about 20 billion euros. Peptides are bio-molecules consisting of amino acid chains that are mostly used in replacement therapy and oncologic treatment.

The most commonly used pathway at industrial level for obtaining synthetic peptides is the solid phase synthesis. This process originates a liquid mixture that contains not only the target peptide, but also residual amounts of reagents and unwanted compounds associated with incomplete synthesis. Since the target compound is used as a drug and its purity required by the pharmaceutical quality control agencies, such as the FDA, is high, it is necessary to efficiently purify the mixture resulting from the synthesis process. Currently, the process of purification of peptides most widely used at industrial level is reverse phase liquid chromatography.

Typically, chromatography is performed in single-column batch mode, however the yield obtained is low. For this reason, research has arisen in order to change the *modus operandi* of the discontinuous chromatography to continuous, which is known to be more efficient. Preliminary results showed that in a single column discontinuous mode the yield obtained is about 50%, while in continuous multicolumn mode the yield rounds the 95%.

The objective of the present work consisted in the application of the principle of chromatography in continuous mode to the separation of peptides mixtures. As the continuous chromatography is in an early stage of development it was necessary to undertake a comprehensive bibliographic review of existing solutions. An experimental installation of continuous preparatory chromatography with three columns for operation in GSSR and MCSGP mode was reconstructed and expanded. Additionally, a simulation model of the unit was developed and it was applied to a case study of the application of the GSSR process. Experiments were also carried out to characterize the columns used in the system and to determine the isotherms of the compounds, which could be used during the experimental validation of the system.

Keywords: Peptides separation, continuous chromatography, Processes Simulation, GSSR

ÍNDICE

Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Siglas	xix
1 Enquadramento e Objetivos	1
1.1 Peptídeos na Indústria farmacêutica	1
1.2 Síntese de peptídeos	2
1.3 Processo de <i>Downstream</i> de Bioprodutos	3
1.4 Cromatografia	4
1.4.1 Modo de funcionamento	5
1.5 Objetivos	6
2 Revisão de Literatura	7
2.1 Leito móvel verdadeiro	8
2.2 Leito móvel simulado	10
2.3 Sistema de purificação com gradiente de solvente em contracorrente utilizando várias colunas	11
2.3.1 Sistema de 6 Colunas	13
2.3.2 Sistema de 3 Colunas	14
2.3.3 Sistema de 2 Colunas	16
2.4 Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário	17
3 Protótipo Desenvolvido	19
3.1 Descrição	19
3.1.1 Funcionamento da bomba	19
3.1.2 Reciclo das correntes de entrada	20
3.1.3 Entrada das correntes de alimentação e de solvente	20
3.1.4 Saída de produto	21
3.1.5 Circuito entre colunas	21
3.1.6 <i>By-pass</i> de colunas	21
3.1.7 Leitura UV	22

3.2	Materiais	22
3.3	Comunicação com o sistema	25
4	Modelo matemático	27
4.1	Balanço mássico	27
4.2	Condições Iniciais	28
4.3	Condições Fronteira	29
4.4	Dispersão Axial	29
4.5	Adsorção	30
4.5.1	Isotérmica	30
4.5.2	Cinética de adsorção	31
5	Modelo e Simulação	33
5.1	Descrição dos modelos	33
5.1.1	Coluna	34
5.1.2	Entradas e Saídas	34
5.1.3	Ligação entre colunas	36
5.1.4	Gradiente de solvente	37
5.2	<i>Case study</i>	37
5.2.1	Balanço mássico da coluna	37
5.2.2	Análise do <i>crude mix</i>	38
5.2.3	<i>Schedule</i>	38
5.2.4	Resultados e discussão	39
5.2.5	Conclusão	44
6	Trabalho Experimental	45
6.1	Materiais	45
6.2	Caracterização da coluna	46
6.2.1	Volume morto	46
6.2.2	Porosidade interparticular	47
6.2.3	Porosidade Total	51
6.3	Isotérmicas	53
6.3.1	Guanosina	55
6.3.2	Uridina	59
6.3.3	Comparação e discussão	59
6.4	Bomba não isocrática	62
7	Conclusões e trabalho futuro	65
	Bibliografia	67

LISTA DE FIGURAS

1.1	Síntese de Peptídeos	3
2.1	Esquema de TMB	8
2.2	Separação de componentes no TMB	9
2.3	Perfil de concentração da espécie no TMB	9
2.4	Comutação do SMB	10
2.5	Dois SMBs em série	11
2.6	Corte central	12
2.7	Perfil de concentração do MCSGP	12
2.8	MCSGP de 6 colunas	14
2.9	Produtividade e pureza do MCSGP	15
2.10	MCSGP de 3 colunas	16
2.11	MCSGP de 2 colunas	16
2.12	GSSR	18
3.1	Flowsheet do processo desenvolvido	23
3.2	Estrutura física da instalação	25
4.1	Tipos de Isotérmica	30
5.1	Esquema do modelo da coluna cromatográfica	34
5.2	Esquema do modelo das entradas e saídas da coluna	36
5.3	Esquema do modelo ligação entre colunas	36
5.4	Cromatograma da mistura de peptídeos utilizada.	39
5.5	Steps do GSSR	40
5.6	C_{out} da coluna 3 do GSSR	41
5.7	C_{out} do composto 1 das colunas do GSSR	41
5.8	C_{out} do composto 2 das colunas do GSSR	42
5.9	C_{out} do composto 3 das colunas do GSSR	42
5.10	C_{out} do composto 4 das colunas do GSSR	43
5.11	C_{out} do composto 5 das colunas do GSSR	43
5.12	Pureza e rendimento obtidos utilizando o GSSR	44
6.1	Método de EAM	47

6.2	Absorvância de BD fazendo by-pass à coluna	48
6.3	Absorvância de BD passando pela coluna 2	50
6.4	Absorvância de BD passando pela coluna 3	50
6.5	Absorvância duma solução aquosa de 90% de etanol passando pela coluna 2	52
6.6	Absorvância duma solução aquosa de 90% de etanol passando pela coluna 3	52
6.7	Concentração de saída da solução de Guanosina nas experiências de isotérmica	57
6.8	Isotérmica da Guanosina	58
6.9	Concentração de saída da solução de Uridina nas experiências de isotérmica	60
6.10	Isotérmica da Uridina	61
6.11	Absorvância de um gradiente de BD fazendo o <i>by-pass</i> à coluna	63
6.12	Absorvância de um gradiente de BD passando pela coluna	63

LISTA DE TABELAS

5.1	Concentração e caudais da correntes utilizadas no GSSR	39
5.2	K' e n dos compostos do GSSR	39
5.3	variáveis temporais do GSSR	40
6.1	Condições de operação e resultados da experiência de Volume morto	48
6.2	Condições de operação para as experiências de obtenção da porosidade interparticular.	49
6.3	Porosidade interparticular e análise probabilística dos resultados obtidos para a coluna 2	49
6.4	Porosidade interparticular e análise probabilística dos resultados obtidos para a coluna 3	50
6.5	Condições de operação para as experiências de obtenção da porosidade total.	51
6.6	Resultados relativos à porosidade total da coluna 2 e respetiva análise probabilística	52
6.7	Resultados relativos à porosidade total da coluna 3 e respetiva análise probabilística	53
6.8	Volume das partículas e dos poros das duas colunas	54
6.9	Concentrações utilizadas de Guanosina e Uridina	54
6.10	Condições de operação para as experiências de obtenção da isotérmica da Guanosina. O volume morto não é o mesmo utilizado nas experiências anteriores, uma vez que foi necessário modificar o sistema, tendo sido realizadas novas experiências para determinar o novo volume morto.	56
6.11	Reta de Calibração da Guanosina	56
6.12	Tempos médios de residência do composto no sistema, dependendo da concentração alimentada de Guanosina para as várias experiências.	57
6.13	Constantes de isotérmica para a Guanosina	58
6.14	Condições de operação para as experiências de obtenção da isotérmica da Uridina.	59
6.15	Reta de Calibração da Uridina	59
6.16	Tempo de saída da solução de Uridina	60
6.17	Constantes de isotérmica para a Uridina	61
6.18	Constante de henry para os compostos analisados	62

SIGLAS

BD	Solução aquosa de Blue dextran.
EAM	Método das áreas equivalentes.
GSSR	Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário.
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão/performance.
MCSGP	Sistema de purificação com gradiente de solvente em contracorrente utilizando várias colunas.
P	Substância de interesse, produto.
S	Substância fortemente retida.
SMB	Leito Móvel Simulado.
W	Substância fracamente retida.

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

1.1 Peptídeos na Indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, a unidade estrutural mais utilizada são as moléculas de pequenas dimensões. No entanto, tem vindo a crescer a quantidade de fármacos cuja unidade estrutural são os peptídeos, tendo sido estimada uma taxa anual de crescimento de 9.41% até 2024 [1]. Os Peptídeos são constituídos por cadeias de aminoácidos conectados por meio de ligações peptídicas [2].

Desde 1980 foram registadas cerca de 240 proteínas e peptídeos para fins clínicos, sendo que aproximadamente 100 já estão a ser comercializados. Em 2016, as vendas relativas a produtos constituídos por peptídeos e proteínas corresponderam a uma receita entre os 15 e os 20 mil milhões de dólares [3], o que equivale a cerca de 10% do mercado total de fármacos [4, 5].

A utilização de peptídeos tem múltiplos benefícios, tais como [6]:

- Eficácia no que diz respeito à ligação peptídeo-recetor;
- Baixos níveis de toxicidade, uma vez que a sua decomposição não deixa resíduos metabólicos tóxicos;
- Utilização em múltiplas terapias, sendo que uma destas vertentes é a reposição de hormonas em casos em que o organismo tem dificuldades em produzir certas hormonas que são essenciais, como é o caso da insulina [4].

Por outro lado, os peptídeos são suscetíveis a degradação por meio de proteases e peptiases, enzimas presentes no trato digestivo, e devem ser administradas por via de injeção, contrariamente ao fármacos constituídos por moléculas de pequenas dimensões que são administrados por via oral.

No entanto, através da síntese controlada e estudada, podem ser implementadas estratégias de modo a modular a farmacocinética, melhorando a performance dos peptídeos [6, 7].

1.2 Síntese de peptídeos

Desde 1901, data de registo do primeiro peptídeo sintético, as barreiras associadas à síntese química, devidas à falta de investigação, foram neutralizadas, pelo que este processo está em crescimento em termos de utilização em detrimento do processo de extração [7].

O processo de síntese pode ser realizado em:

1. Fase líquida. Este processo, apesar de continuar a ser utilizado, tem algumas desvantagens no que toca à solubilidade das fases utilizadas e ao acréscimo de dificuldade do processo de purificação de cadeias longas de aminoácidos. No entanto é um processo mais antigo e com bastante informação [8].
2. Fase sólida. Este processo é mais rápido e simples no que diz respeito ao processo de síntese, uma vez que todo o processo é realizado no mesmo recipiente. Quanto ao processo de separação, este é benéfico uma vez que há menos perdas de produto tornando o processo mais eficiente. Este processo tem sido alvo de investigação, o que permite um vasto conhecimento e, conseqüentemente, a redução dos preços de produção [9, 10].

A síntese dos peptídeos mais antigos continua a ser realizada em fase líquida, no entanto o processo em larga escala de novos peptídeos é realizado maioritariamente em fase sólida.

Em termos de ligação, a síntese de peptídeos é, normalmente, feita entre o grupo carboxílico do aminoácido a ser acoplado e o terminal N da cadeia já existente. No entanto, os aminoácidos têm múltiplos grupos reacionais, pelo que devem ser evitadas reações secundárias nas quais as ligações são realizadas através destes grupos reacionais. É, portanto, necessário proteger os grupos reacionais de modo a disponibilizar apenas o grupo carboxílico e o terminal N, mitigando assim as reações secundárias.

O processo de ligação de aminoácidos para a obtenção de um peptídeo pode ser observado na figura 1.1a. O esquema de desproteção dos diversos grupos funcionais do peptídeo obtido está representado na figura 1.1b [11].

Não obstante, a reação não ocorre como seria desejável, uma vez que alguns dos aminoácidos não são adicionados à cadeia já existente. Desta forma, são obtidos peptídeos que diferem dos desejados por apenas alguns aminoácidos, sendo que não têm as mesmas características a nível funcional. Esta combinação de aminoácidos constitui uma mistura de separação difícil, uma vez que as características dos peptídeos obtidos são muito semelhantes.

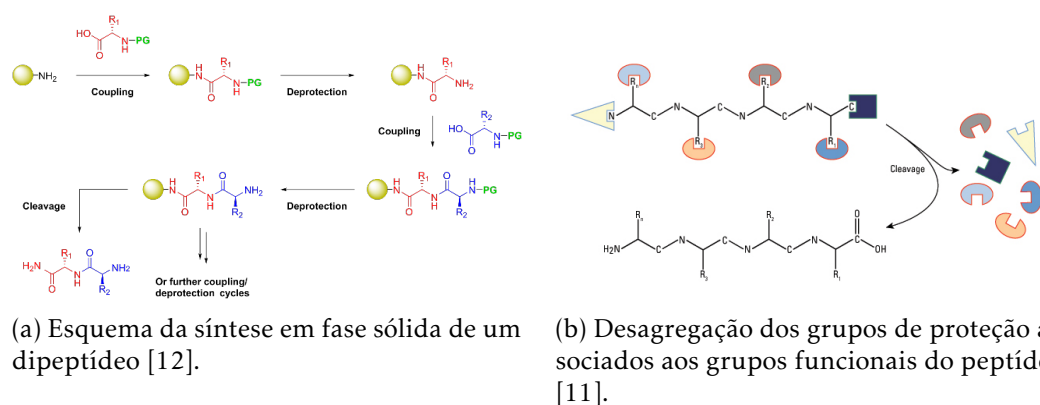


Figura 1.1: Síntese de Peptídeos

1.3 Processo de *Downstream* de Bioprodutos

Um processo pode ser dividido em duas grandes fases, o *upstream*, onde ocorre a preparação das matéria primas e a reação, e o *downstream* que é responsável pela obtenção e purificação do produto no seu estado final de consumo.

Tipicamente, o processo de *downstream* pode ser dividido em 4 fases [13, 14]:

1. **Separação sólido-líquido**, consiste numa separação da solução, proveniente da última fase de *upstream*, que contém: produto, microrganismos e meio de cultura. Sendo que a fase líquida é constituída pelo produto-alvo e algumas impurezas de pequenas dimensões. Por outro lado, a fase sólida é constituída pelos microrganismos, o meio de cultura e as impurezas de maiores dimensões. Este passo pode ser obtido por meio de centrifugação ou filtração.
2. **Concentração**, que é responsável pela separação de compostos que diferem substancialmente nas características físico-químicas, essencialmente volatilidade ou tamanho molecular. Este passo é realizado, recorrendo a métodos como evaporação, extração líquido-líquido, adsorção, filtração por membrana ou precipitação.
3. **Cromatografia**, sucede o passo de concentração, no qual é diferenciado o produto alvo das impurezas que lhe estavam associadas. Após este passo, afigura-se necessário recorrer a um passo de purificação com vista à obtenção do produto desejado. Para este efeito é utilizado o processo cromatográfico.
4. **Formulação**, em que é realizada a estabilização do produto. Isto é, o produto já tem a pureza desejada. No entanto é necessário proceder à estabilização do produto para efeitos de armazenamento e distribuição, recorrendo-se a processos de cristalização e *spray-drying*.

No entanto, quando estamos perante um processo de síntese de peptídios ou proteínas os passos de separação e de concentração não são necessários. Isto sucede-se porque o *crude mix* não contém resíduos oriundos de atividade biológica como meio de cultura,

células e produtos intra-celulares, contendo apenas resíduos com características idênticas às do produto de interesse. Pelo que, neste processo o passo de purificação é o de maior importância. Adicionalmente, é de notar que, quando nos referimos ao *downstream* de bio produtos, é necessário ter em conta as condições de degradação das moléculas, como temperatura, pressão e concentração de sais [15].

Na produção de produtos para uso farmacêutico, as purezas requeridas são muito elevadas, entre 95 e 99(%v/v). Esta alta pureza é muitas vezes alcançada em prol da recuperação, uma vez que são precisas múltiplas operações unitárias e em cada uma destas etapas é perdido parte do produto pretendido. A complexidade e o baixo recuperação da fase de purificação contribuem para que esta seja a fase mais dispendiosa do processo, atingindo cerca de 80% do custo total de produção [16].

1.4 Cromatografia

Resumidamente, a cromatografia pode ser utilizada com duas finalidades distintas. Por um lado é utilizada para a identificação dos componentes presentes numa mistura, por outro lado é utilizada para a purificação de misturas. Independentemente da finalidade, o princípio adjacente é o mesmo, separação dos compostos com base nas diferenças das características das várias moléculas presentes na mistura.

As diferenças nas características dos composto levam a diferentes interações entre os componentes e as fases presentes na coluna cromatográfica. Estas interações podem ter como base o tamanho, carga, afinidade, e polaridade dos diferentes compostos.

Quanto à composição, uma coluna cromatográfica é constituída por duas fases:

- A fase estacionária, constituída por um sólido adsorvente, que deve ser escolhida consoante a característica a explorar.
- A fase móvel, que no caso da cromatografia líquida, é constituída por um líquido. Este serve para eluir a mistura alimentada à coluna, servindo de meio de transporte. Esta fase deve ser selecionada tendo em conta os compostos presentes na mistura e o nível de separação que é requerido.

Aprofundando, o princípio de separação reside na interação entre os compostos presentes na mistura alimentada à coluna e as fases móvel e estacionária. Esta diferença entre as interações permite uma separação dos compostos, isto é, os componentes com maior afinidade para a fase estacionária têm um maior tempo de retenção e movem-se mais lentamente enquanto que os componentes com menor afinidade têm um menor tempo de retenção e movimentam-se mais rapidamente, sendo eluídos em primeiro lugar.

Quanto às condições de operação a cromatografia divide-se em diversos tipos, sendo que o mais utilizado para processos de separação é a cromatografia realizada numa coluna e muitas das vezes esta coluna é operada a elevadas pressões, HPLC, de modo a

compensar a perda de carga, possibilitando a utilização de uma fase estacionária constituída por partículas de menor dimensão, que por sua vez tem uma maior área superficial, promovendo a interação entre fases [17].

No que toca à separação de macro-moléculas, como é o caso dos peptídeos, a cromatografia tem como base as interações hidrofóbicas e de permuta iónica. Em particular, a separação de peptídeos explora as características hidrofóbicas das moléculas, uma vez que reduz a possibilidade de desnaturação dos peptídeos, comparando com a cromatografia de permuta iónica [18]. Como vimos anteriormente em 1.2, os peptídeos obtidos têm composições muito similares, no entanto as pequenas diferenças existentes geram uma conformação espacial (estrutura terciária) diferente entre as várias moléculas. Consequentemente, as moléculas diferem relativamente às zonas hidrofóbicas expostas, pelo que vão interagir de modo diferente com a fase estacionária. É portanto utilizada uma cromatografia com base nas interações hidrofóbicas, mais especificamente cromatografia de fase reversa, em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel é maioritariamente polar, sendo que uma porção do solvente é necessariamente de origem orgânica.

A fase móvel é normalmente constituída pela mistura entre água e um álcool, como o metanol ou o isopropanol. Quando nos referimos a álcoois cuja viscosidade é baixa, é necessário adicionar água, de modo a aumentar a viscosidade total da solução e, consequentemente diminuir a perda de carga associada. Por outro lado, podem ser também utilizados compostos orgânicos como é o caso do acetonitrilo cuja viscosidade é elevada existindo a necessidade de baixar este parâmetro, de modo a diminuir a pressão exercida pela bomba sobre o líquido.

A fase estacionária, é constituída por uma base de sílica que é complementada, de modo a tornar-se apolar, adicionando cadeias de hidrocarbonetos com 8 ou 18 carbonos à sua superfície [19].

1.4.1 Modo de funcionamento

A cromatografia tradicional é um processo que opera em *batch*. A mistura é alimentada periodicamente numa extremidade da coluna e as frações puras são recolhidas na extremidade oposta, sendo que as frações que não satisfazem os requisitos de pureza são descartadas.

Recentemente tem-se vindo a aumentar o interesse em transformar este processo, de modo a atingir um modo contínuo de operação. Esta preocupação surge, principalmente, pela vasta utilização do processo cromatográfico e a baixa produtividade do processo em *batch*. Uma vez que um processo contínuo garante um maior aproveitamento do composto alvo é obtida uma redução no custo do produto, uma vez que este é rentabilizado [20].

De modo a conseguir um processo contínuo, é também necessário que este se torne um processo automatizado, uma vez que é um sistema com maior grau de complexidade.

Um processo automatizado permite:

- Recolha de dados em linha, o que ajuda a tomar decisões em tempo real;

- Menor margem para erros humanos, uma vez que há uma menor interação com o sistema, alcançando assim um aumento na produtividade [21].

1.5 Objetivos

Tendo em conta as necessidades do mercado, os objetivos da dissertação são os seguintes:

- Elaboração de um processo cromatográfico para separação em contínuo de misturas ternárias, com ênfase para a separação de peptídeos;
- Construção de um modelo matemático que defina o sistema;
- Montagem da instalação referente ao processo idealizado;
- Simulação do processo.

REVISÃO DE LITERATURA

Tendo como ponto de partida os objetivos e função do sistema a desenvolver, é necessário realizar uma revisão de literatura de modo a compreender o funcionamento das soluções já existentes. Estas soluções vão ser enunciadas e descritas no presente capítulo, assim como os prós e contras das mesmas, tendo em conta a finalidade desejada.

Resumidamente, os objetivos do sistema são:

- Separação de uma mistura ternária recorrendo à cromatografia
- Operação em modo contínuo ou semi-contínuo.
- Elevado rendimento do processo.

Considerando os objetivos apresentados, os sistemas de maior relevância para uma revisão bibliográfica são:

- Leito móvel simulado, SMB, que opera de modo contínuo para a separação de misturas binárias. Embora seja destinado para a separação de misturas binárias é interessante e relevante perceber este método de funcionamento, uma vez que serve também de base para outros sistemas. No entanto, o conjunto de dois SMB conectados em série, pode separar misturas ternárias
- Purificação com gradiente de solvente em contracorrente utilizando várias colunas, MCSGP, este sistema opera de modo semi-contínuo para a separação de misturas ternárias sendo um sistema não isocrático, isto é, a concentração de eluente não se mantém constante.
- Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário, GSSR, este sistema é semelhante ao MCSGP, com a particularidade de que a alimentação e a recolha de produto são sempre efetuadas na mesma coluna.

2.1 Leito móvel verdadeiro

A tecnologia de leito móvel verdadeiro, TMB em inglês, permite a injeção contínua e a separação de misturas binárias. O TMB envolve a circulação real do sólido no sentido oposto à circulação do fluido. O contacto oposto entre o sólido e o líquido maximiza a força motriz da transferência de massa, levando a uma redução significativa do uso das fases móvel e estacionária em comparação com a cromatografia de eluição.

O TMB tem duas correntes de entrada, a do eluente e da alimentação. Sendo que a alimentação é constituída pela mistura multi-componente, alvo de separação, que contém o produto alvo juntamente com impurezas. Deste modo, temos duas correntes de saída, o extrato, que contém o componente mais adsorvido, e o refinado, que contém o composto menos adsorvido. Um esquema deste sistema pode ser visto na figura 2.1 [22] [23].

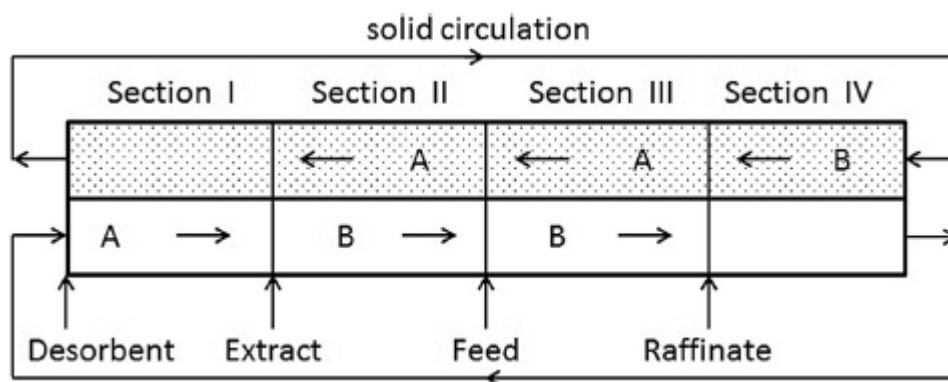


Figura 2.1: Representação do TMB. O sólido é representado pela letra A, e o líquido representado pela letra B. O sentido do movimento das duas fases é contrário, sendo que opera em contra-corrente. A alimentação é feita entre as secções II e III e a recolha de extrato é feita entre as secções I e II, a recolha de refinado é feita entre as secções III e IV. Por fim o eluente “fresco” é inserido no início da secção I [22].

Cada sistema divide-se em quatro secções, em que cada secção pode ser constituída por mais de uma coluna consoante a necessidade de separação. Cada uma destas secções tem um papel específico. Abaixo está representada a função de cada secção.

- **Secção I** - Sólido é regenerado antes de envia-lo para a secção 4, eluindo as espécies mais adsorvida.
- **Secção II** - O composto menos retido é dessorvido de modo a evitar contaminação da corrente de extrato.
- **Secção III** - A espécie mais adsorvida é dessorvida de modo a evitar contaminação da corrente de refinado.
- **Secção IV** - O eluente é regenerado antes de envia-lo para a secção 1, adsorvendo as espécies menos retidas.

Este percurso das espécies pode ser observado na figura 2.2 e analisado em termos de concentração na figura 2.3.

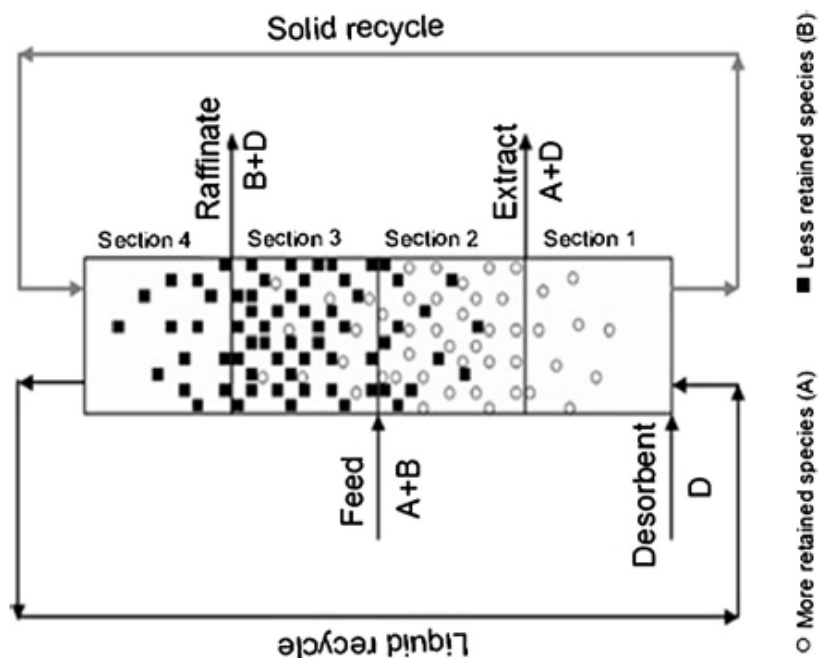


Figura 2.2: Esquema de TMB com ênfase no percurso das espécies mais e menos retidas [22].

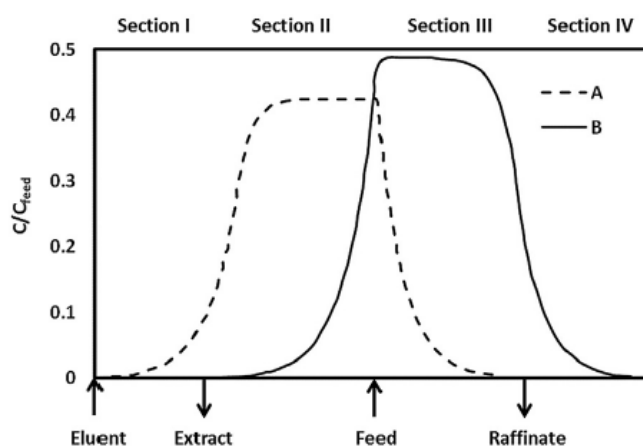


Figura 2.3: Gráfico de concentração dos compostos mais (B) e menos (A) retidos ao longo do perfil axial das várias colunas constituintes do sistema [22].

Nas figuras 2.2 e 2.3 podemos ver a separação das espécies, tendo como referência o sitio onde é feita a alimentação. A espécie mais retida segue com o sólido, sendo removida entre as secções I e II. Contrariamente, a espécie menos retida segue com o eluente, sendo removida entre as secções III e IV. Resumidamente, nas regiões II e III dá-se a separação

entre espécies, enquanto que nas secções I e IV são efetuadas as regenerações do sólido e do líquido, respetivamente.

Este sistema é apenas uma idealização e constitui um modelo teórico, uma vez que não é transposto para a prática pelas complicações que tem associado. Estas complicações estão relacionadas com a própria contra-corrente, trazendo problemas de abrasão do equipamento, causada pelo contacto entre a coluna e o sólido. Igualmente, o contacto entre as partículas de enchimento é também prejudicial, causando o desgaste do adsorvente [22].

2.2 Leito móvel simulado

Os problemas associados ao leito móvel real são resolvidos com uma aproximação à contracorrente, dando origem a um sistema de leito móvel simulado, SMB em inglês.

O SMB simula o TMB, utilizando várias colunas dispostas em série e, adicionalmente, a localização das portas de entrada e saída são comutada no sentido da circulação do fluido, como é mostrado na Figura 5.1. Ou seja, as unidades de SMB e TMB são equivalentes quando as secções integrantes de um SMB são constituídas por um elevado número de colunas e a comutação de portas ocorre com elevada frequência. No sistema SMB, a localização das portas de entrada e saída são comutada no sentido da circulação do fluido, em vez do movimento do sólido, como é mostrado na Figura 5.1.

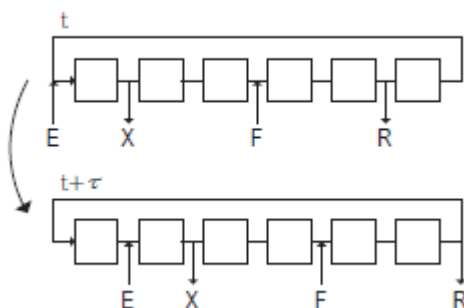


Figura 2.4: Esquema do SMB antes e depois de um passo de rotação. Passado um determinado tempo, τ , a comutação das portas é feita no sentido do caudal de fluido. Ou seja, as correntes são movidas, neste caso, para a direita pela razão de uma coluna, mantendo o número de colunas por secção por exemplo o número de colunas entre o *feed* e o refinado é mantido, sendo sempre de 2 [24].

Em 1961 surgiu a primeira patente referente a um processo que tem como base o sistema de SMB, que foi apresentado pela UOP. Esta tecnologia foi desenvolvida, inicialmente, tendo em vista as áreas de refinação de petróleo e a petroquímica, ficando conhecido como o processo de Sorbex. Atualmente, este processo é também utilizado nas indústrias farmacêuticas e do açúcar [22] [25].

Focando agora nas (1) vantagens e (2) desvantagens deste processo.

1. Aproveitamento do sólido. A mistura é continuamente alimentada ao processo

2.3. SISTEMA DE PURIFICAÇÃO COM GRADIENTE DE SOLVENTE EM CONTRACORRENTE UTILIZANDO VÁRIAS COLUNAS

e está também em contacto contínuo com a fase sólida, é necessária uma menor quantidade de sólido;

Produtividade é superior, uma vez que o processo se torna mais rápido e eficiente;

Aproveitamento de solvente e obtenção do produto com uma maior concentração. O solvente é recirculado, deste modo há um menor desperdício e o respetivo aproveitamento do solvente, sendo que o produto é também retirado do sistema com uma maior concentração;

2. Separações binárias. Este método é apenas válido para a separações de misturas binárias, no entanto, uma possível solução para o tratamento de misturas ternárias é a utilização de dois SMB em série, como mostrado na figura 2.5. Sendo que esta possibilidade foi estudada por Hur e Wankat [26]. Porém, esta solução aumenta o custo inicial do processo.

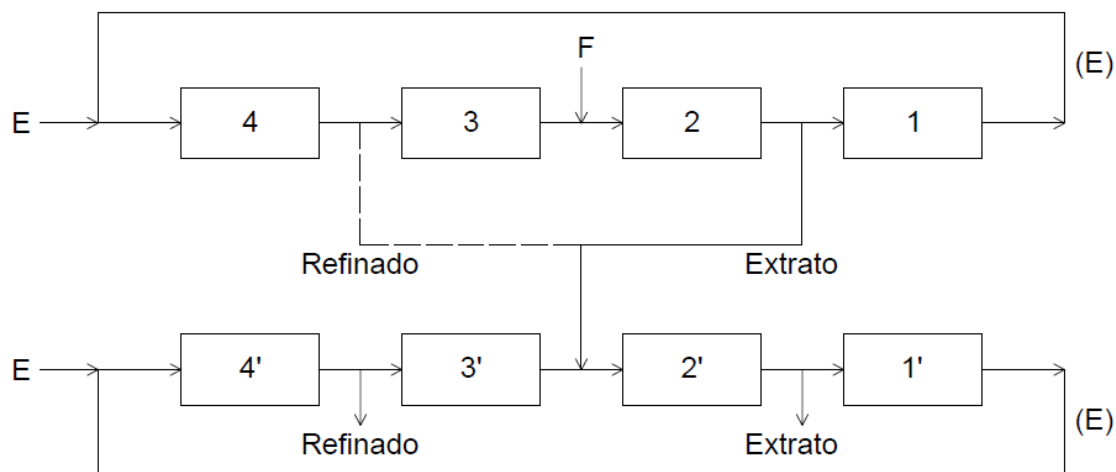


Figura 2.5: Sistema de dois SMB em serie para o tratamento de misturas ternárias. As duas zonas funcionam como uma SMB convencional, em que a corrente de extrato ou refinado, conforme a corrente que contém o composto pretendido, é canalizada para o segundo sistema de SMB servindo de corrente de alimentação, F. Figura adaptada de [26].

2.3 Sistema de purificação com gradiente de solvente em contracorrente utilizando várias colunas

Em 2007 foi desenvolvido, por parte de Morbidelli e colegas, um processo cromatográfico para separação ternária utilizando um gradiente de solvente para a dessorção, MCSGP em inglês. Este sistema tem por base o sistema de SMB e o princípio de cromatografia rudimentar [27–29].

Quando falamos em misturas ternárias ou pseudo-ternárias estamos perante misturas constituídas por três frações. O processo de obtenção da fração intermédia, que é o caso do produto desejado em relação ao *crude mix*, consiste numa separação de corte central, representado na figura 2.6. De modo a aumentar o rendimento do processo, as partes sobrepostas de produto e resíduo são aproveitadas, seguindo para uma separação posterior.

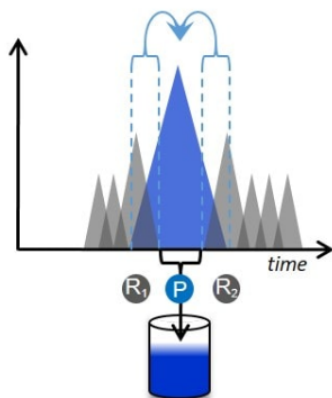


Figura 2.6: Esquema de um cromatograma e respetiva explicação de um processo de separação de corte central. As frações impuras, que contêm produto, são reaproveitadas para posterior purificação [30].

Neste sistema é utilizado um gradiente de solvente de modo a separar tanto as substâncias menos retidas como as mais retidas. Para uma concentração menor de eluente as substâncias menos fortemente adsorvidas são removidas, no entanto as substâncias mais fortemente retidas são apenas removidas fazendo uso duma concentração mais elevada de eluente. A figura 2.7 mostra a concentração das substâncias e do solvente ao longo do tempo.

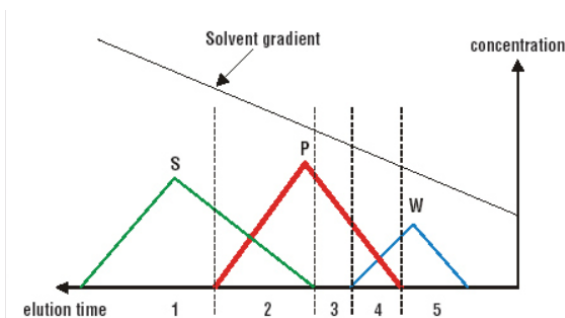


Figura 2.7: Perfil de concentrações tanto da corrente de saída como do eluente injetado no processo de MCSGP. Em primeiro lugar são eluídas as substâncias menos retidas, W, e por ultimo as substâncias mais retidas, S [31].

O processo de MCSGP consiste na disposição de, pelo menos, duas colunas cromatográficas cujas correntes são comutadas na direção do fluxo do fluido, aparentando o

2.3. SISTEMA DE PURIFICAÇÃO COM GRADIENTE DE SOLVENTE EM CONTRACORRENTE UTILIZANDO VÁRIAS COLUNAS

movimento da coluna, uma vez que adquire funções diferentes. As colunas cromatográficas estão conectadas em série de tal forma que, à medida que a mistura se move através das colunas, o composto é purificado em várias frações.

Este processo combina duas técnicas de separação cromatográfica:

1. Utilização de um gradiente de eluente. Para a purificação de bio-moléculas, é conveniente um gradiente suave de solvente, uma vez que muitas atividades biológicas são influenciadas pela concentração externa e não se deseja uma diferença muito dispar na concentração de solvente [15];
2. Sistema contínuo em contracorrente simulado, SMB. O processo consiste em várias colunas cromatográficas, que são comutadas em posição oposta à direção do fluxo, de modo a otimizar o processo.

Muitas vezes, as resinas preparativas têm uma baixa eficiência devido à forte dispersão axial e transferência de massa lenta. Deste modo, a utilização de um processo de purificação com apenas uma etapa cromatográfica não apresenta resultados satisfatórios. Existem artigos e investigação, realizados no sentido da utilização de sistemas com 6, 3 e 2 colunas. Estes sistemas vão ser analisados, com um nível baixo de detalhe, de modo a perceber apenas o princípio de funcionamento de cada um.

2.3.1 Sistema de 6 Colunas

O sistema, representado na figura 2.8, funciona como duas secções distintas, uma secção que opera em Batch em que são retirados os compostos conforme especificação (pureza mínima requerida) e outra zona que opera em contínuo para a qual segue a restante mistura. Ou seja, as frações impuras são transferidas de uma coluna cromatográfica para a seguinte. Esta reciclagem é feita automaticamente e não requer análise de pureza posterior. Durante esta transferência, são adicionadas correntes de alimentação e eluente “frescas”. Isto assegura uma operação contínua e conduz a um rendimento elevado.

De modo a perceber como funciona este sistema será explicitado a função de uma coluna na várias posições:

- Na posição 6, é recolhida a mistura de vW. Seguidamente a coluna passa para a posição 3, quando a corrente de saída é composta pelo produto-alvo, conforme especificação.
- Na posição 3, é adicionada a corrente de alimentação e é recolhida a fração correspondente às impurezas que ficam menos retidas, W. A coluna segue para a posição 5 quando a corrente de saída é composta pela mistura de , w, e o produto-alvo ,P.
- Na posição 5, é removida a mistura de w e P. Quando a corrente de saída é composta pela fração do composto-alvo, conforme especificação, a coluna passa para a posição 2.

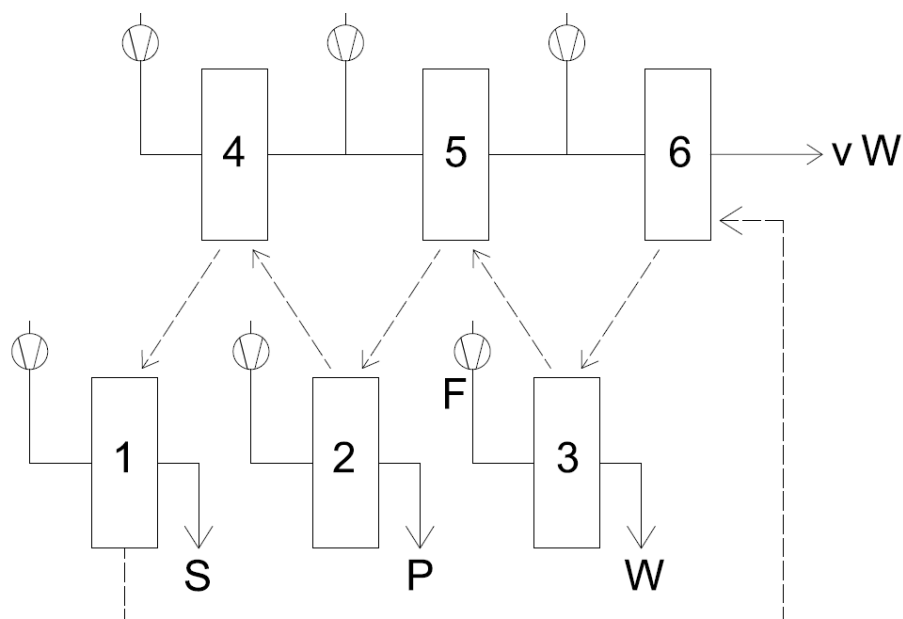


Figura 2.8: Esquema do sistema MCSGP de 6 colunas, adaptado de [31]. A comutação das correntes de entrada é cíclica e feita em co-corrente, em que o percurso das colunas, relativamente às posições estabelecidas é 6->3->5->2->4->1->6. As colunas que ocupam as posições inferiores operam em batch, onde são recolhidas as frações conforme especificação. Por outro lado as colunas que ocupam as posições superiores operam em modo contínuo, estando interligadas. Adaptado de [31].

- Na posição 2, é recolhida a fração de P. Quando começa a sair uma mistura de S e P, esta coluna segue para a posição 4;
- Na posição 4, é removida a mistura de P e S. A coluna passa para a posição 1 quando a corrente de saída deixa de ter o composto-alvo em concentrações relevantes.
- Na posição 1, é recolhida a fração corresponde às impurezas fortemente adsorvidas, S. A posição 1 corresponde ao fim do ciclo, ou seja, quando a coluna chega a esta posição a solução já foi separada, pelo que a coluna volta para a posição inicial, 6.

Este sistema foi verificado experimentalmente para a purificação da hormona de calcitonina, a partir de uma mistura multi-componente de peptídeos. Foi determinado que para um pureza de 93% (pureza exigida) é alcançado um rendimento próximo de 100%, no sistema MCSGP. No entanto, a recuperação dos mesmos componentes com o mesmo grau de pureza, num processo batch, é de 66%. Neste sistema, como em muitos outros, a produtividade é inversamente proporcional ao rendimento como podemos observar na figura 2.9

2.3.2 Sistema de 3 Colunas

O sistema de 6 colunas pode ser otimizado para a utilização de apenas 3 colunas. Isto é possível, porque o sistema de seis colunas é constituído por duas secções, a que opera em

2.3. SISTEMA DE PURIFICAÇÃO COM GRADIENTE DE SOLVENTE EM CONTRACORRENTE UTILIZANDO VÁRIAS COLUNAS

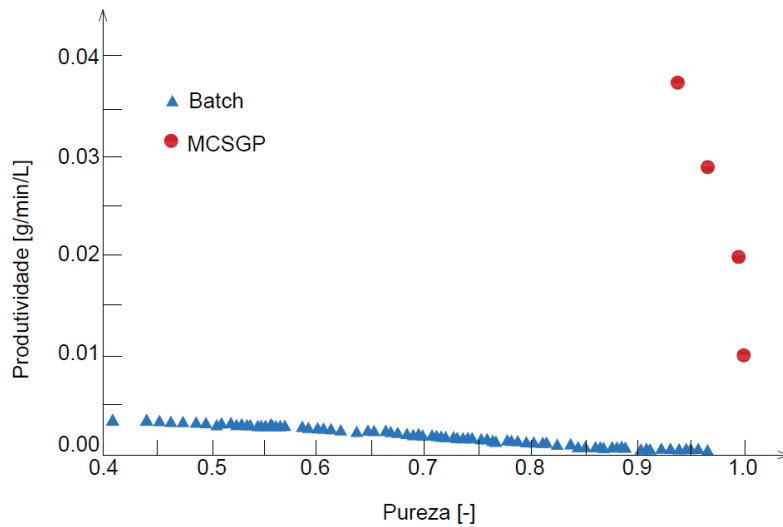


Figura 2.9: Produtividade em função do rendimento. No presente gráfico podemos estabelecer uma comparação entre a separação utilizando o MCSGP e batch. Podemos ver que para a separação recorrendo ao MCSGP é obtida uma produtividade muito mais elevada quando comparada com a separação em batch. No entanto para MCSGP a relação entre pureza e produtividade é mais acentuada, sendo que o declive da reta é muito maior em módulo [27].

batch e a que opera em contínuo, sendo que estas secções operam independentemente. O sistema, de 3 colunas, intercala a operação em batch e contínuo, sendo bastante viável no sentido de redução de custos com enchimento e custo inicial das colunas e bombas. No entanto, este processo é semi-contínuo ao invés de contínuo como é o caso do sistema com 6 colunas.

Adicionalmente o sistema de 3 colunas, representado na figura 2.10, pode ser benéfico uma vez que é acrescentado um grau de liberdade. No entanto, num sistema com 6 colunas o tempo de comutação é o mesmo para as duas secções. Pelo contrário, num sistema em que há apenas uma secção que serve as duas finalidades, o tempo de comutação pode ser distinto. Deste modo, o sistema com 3 colunas opera com dois tempos de comutação diferente, o tempo t_B , onde as colunas operam no modo batch e o tempo t_C , onde as colunas operam em série.

Analisando a função da mesma coluna em posições diferentes podemos verificar que:

- Posição 3. O *Feed* é adicionado à coluna, sendo recolhida a fração de vW , em seguida, é aberta a válvula de modo a recolher a fração corresponde a W . A coluna passa para a posição 2 quando a corrente de saída contém uma mistura de W e P .
- Posição 2. Primeiramente é re-circulada a mistura de w e p , em seguida é recolhida a fração "pura" de P . A coluna passa para a posição 1 quando a corrente de saída contém uma mistura de S e P .
- Posição 1. Primeiramente é recirculada a mistura de s e P , em seguida é recolhida a

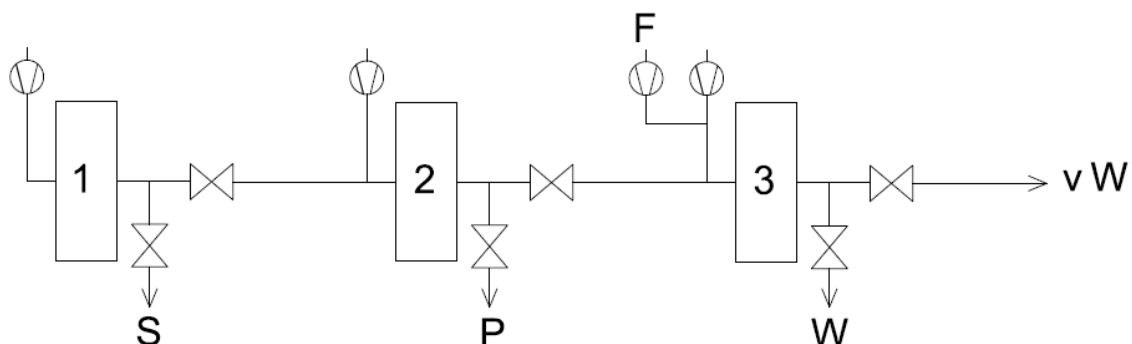


Figura 2.10: Esquema de montagem de um processo MCSGP de 3 colunas. Adaptado de [28].

fração “pura” de S. No final deste passo, a coluna presente nesta posição volta para a posição 3 e o processo é repetido.

2.3.3 Sistema de 2 Colunas

O MCSGP de 2 colunas, representado na figura 2.11, é utilizado para a separação semi-continua de misturas ternárias. No entanto é propício o uso de misturas em que não haja componentes com tempos de retenção muito díspares, deste modo a separação consegue ser realizada nas duas colunas disponíveis, não sendo necessária a utilização de um solvente mais “forte” para a dessorção das moléculas mais retidas [29].

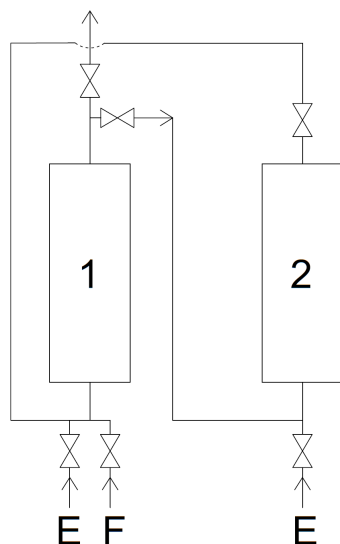


Figura 2.11: Esquema do sistema MCSGP de 2 colunas. A mistura é alimentada à coluna 1, e as frações puras são removidas do sistema e coletadas enquanto que as zonas de sobreposição tanto de W e P como P e S são encaminhadas para a coluna 2. Na coluna 2 as zonas de sobreposição são separadas, aumentando o rendimento do processo [29].

Experimentalmente, uma das utilizações deste processo, é a separação de uma mistura proveniente de cânabis. Nesta mistura o produto alvo é um composto utilizado para o

alívio das dores, Canabidiol, no entanto é necessário remover os restantes componentes como é o caso da Tetraidrocanabinol (THC), que tem efeitos psicoativos.

2.4 Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário

O sistema de Gradiente de solvente com reciclo em estado estacionário, GSSR em inglês, é um processo cromatográfico para a separação de misturas ternárias que opera em semi-contínuo e está representado na figura 2.12. Mais concretamente, consiste na disposição em serie de 3 colunas cuja concentração do solvente alimentado é feita sob a forma de gradiente, para eluição dos compostos e a mistura alimentada ao sistema vai sendo separada [32].

Este processo é análogo ao de MCSGP de 3 colunas, na medida em que simula o movimento de contracorrente e faz uso do gradiente da concentração do solvente. No entanto, a corrente de alimentação é sempre injetada na mesma coluna e o produto sempre recolhido na mesma coluna. O processo pode ser observado como a sobreposição de três eventos, um passo de alimentação, outro respetivo ao movimento e gradiente do solvente, e por fim a recolha de produto.

Um dos parâmetros para a seleção do solvente ou o intervalo do gradiente, é a zona de interceção entre as impurezas e o composto alvo. Esta sobreposição pode ser de elevada dimensão, pelo que são necessários gradientes suaves de eluente de modo a separar estas frações. Adicionalmente, para mistura com impurezas que ficam fortemente absorvidas é necessária uma limpeza no local, sendo que esta limpeza é feita com um solvente mais forte que os anteriormente utilizados.

Em termos de funcionamento este sistema será observado com maior detalhe no capítulo de simulação, onde será realizado um *Case study* deste processo e vão ser explicados os vários passos de cada ciclo, assim como algumas variáveis de processo, como concentração e caudal de solvente e tempos de comutação. O processo de GSSR foi experimentalmente validado para a separação de uma mistura de peptídeos numa coluna de fase reversa. A mistura de peptídeos continha cerca de 5% (V/V) de produto-alvo, sendo que algumas das impurezas tinham tempos de retenção muito idênticos ao do produto de interesse. Perante estas condições e para uma pureza de 98% do produto-alvo foi alcançado um rendimento de 95.3% relativamente ao produto desejado. Por outro lado, num processo batch foi estimado um rendimento de apenas 52% para a mesma pureza [32].

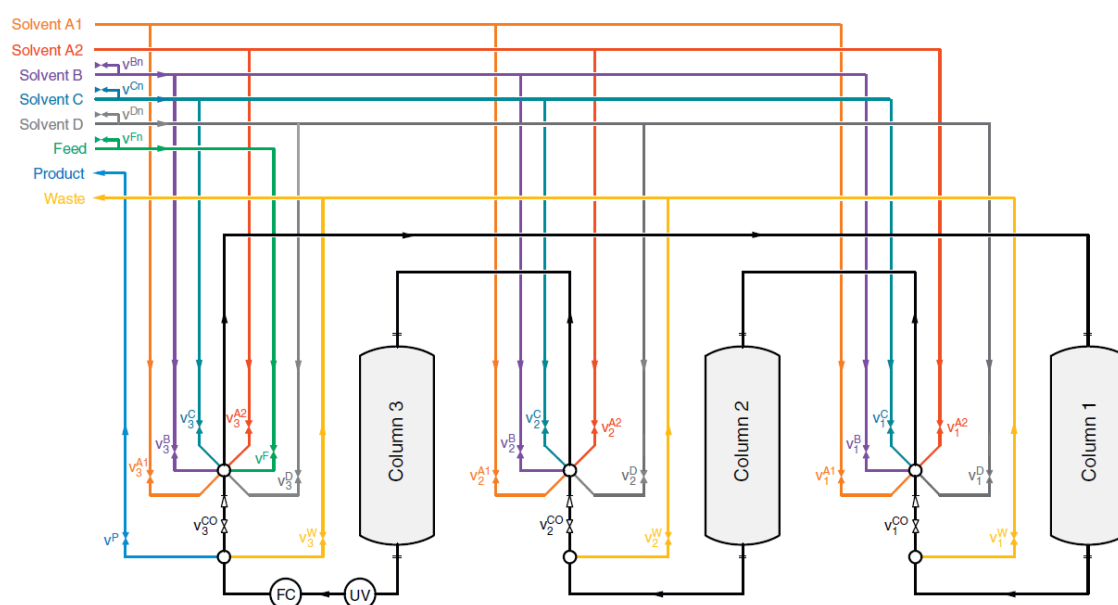


Figura 2.12: Esquema gráfico do sistema GSSR e das várias correntes conectadas às colunas. Podemos repara que a corrente de alimentação está apenas conectada à entrada da coluna na posição 1 e por outro lado a corrente de recolha de produto está apenas conectada à saída da coluna da posição 3 [32].

PROTÓTIPO DESENVOLVIDO

A revisão bibliográfica foi fundamental para idealizar e conceber um novo sistema. Como foi observado no capítulo da revisão bibliográfica, muitas das soluções existentes são uma variação do sistema MCSGP. O presente sistema tem como base a união de um sistema MCSGP de 3 e 2 colunas.

O objetivo do presente capítulo é de explicitar o sistema em termos funcionais, ou seja, analisar a função dos vários elementos. Adicionalmente, serão também explicitados os materiais e métodos utilizados para a montagem e realização de experiências de confirmação da correta montagem do sistema.

3.1 Descrição

Em termos funcionais é importante salientar e interpretar algumas das características mais relevantes do sistema:

1. Tipo e funcionamento das bombas;
2. Reciclo das corrente de entrada;
3. Entrada das correntes de alimentação e de solvente;
4. Saída de produto;
5. Circuito entre colunas;
6. *By-pass* de colunas;
7. Leitura UV.

3.1.1 Funcionamento da bomba

Em termos de funcionamento da bomba, podemos considerar dois tipos de bomba:

Bomba isocrática, ou seja não realiza gradiente de concentrações. Esta bomba tem unicamente a função de extrair o líquido e fornecer-lhe pressão. É utilizada para a corrente de alimentação e dos solventes, cuja concentração se mantém constante.

Bomba não isocrática, ou de gradiente, que permite alterar as concentrações de solvente. Esta bomba pode realizar a mistura de dois solvente alterando a concentração da mistura final. Por exemplo, para uma concentração de 5/95 (%V/V) de etanol/água a bomba irá misturar 5% de etanol e 95% de água, ou para uma concentração de 50/50 (%V/V) de etanol/água a bomba irá misturar 50% de etanol e 50% de água. O gradiente pode ser linear, ou seja a variação da concentração é constante ao longo do tempo. Por outro lado, o gradiente pode ser realizado em degrau, em que a variação da concentração é realizada periodicamente.

Um das alternativas à bomba de gradiente seria a utilização de duas bombas isocráticas, em que cada uma fornece um caudal volumétrico, consoante a concentração pretendida. Mais à frente, na secção 6.4, será estudada a eficiência da mistura realizada pela bomba de gradiente.

3.1.2 Reciclo das correntes de entrada

Em todas as saídas da bomba existem dois caminhos possíveis, o que segue para o sistema e o que volta para o recipiente, que constitui um reciclo da solução alimentada. Este reciclo é feito de modo a que, quando a solução em causa não é utilizada, volta para o recipiente andando em *loop*. Esta reciclagem poderia ser evitada com a paragem da bomba, no entanto, o processo de ligar/desligar a bomba não é instantâneo e pode causar variações no caudal. Exemplificando, para a corrente de alimentação, F, a bomba está continuamente a retirar o líquido do recipiente F e a enviá-lo para a corrente C1, se as válvulas adjacentes às correntes C3, C4 e C5 estiverem fechadas ir-se-ia criar pressão no sistema e a bomba atingiria a pressão máxima. No entanto a válvula adjacente à corrente C2 é aberta fazendo com que o líquido saia do recipiente, passe pela bomba para a corrente C1, seja encaminhado para a corrente C2 e por fim segue novamente para o recipiente F.

3.1.3 Entrada das correntes de alimentação e de solvente

Em termos das entradas das correntes de alimentação e solventes, estas são auto explicativas tendo em conta a figura 3.1. As correntes que serão alimentadas à coluna convergem no conector colocado anteriormente à própria coluna.

Recorrendo novamente à corrente de alimentação, como exemplo, será explicado o percurso da solução desde o recipiente de alimentação, F, passando pela coluna 1 e acabando no recipiente de resíduos. O líquido é recolhido pela bomba, passa pela corrente C1, como a corrente C2 está “fechada”, o líquido continua na C1 seguindo para o conector A3. O conector A3 junta 4 correntes, 1 de entrada e 3 de saída, podendo apenas estar “aberta” a corrente de entrada e apenas uma corrente de saída. A solução segue para a

coluna 1, pelo que a corrente C3 está aberta e as correntes C4 e C5 estão "fechadas". O líquido passa pelo conector A6, é direcionado para a corrente C17, passa pela coluna pela corrente C20, C23, C24 chegando ao conector A9, onde a corrente é direcionada para a corrente C33 ("fechando" as correntes C27, C30 e C38).

3.1.4 Saída de produto

Quando o líquido sai da coluna pode percorrer vários caminhos, sendo que um deles leva à sua remoção do sistema. Mais concretamente, para o caso de remoção do sistema, o líquido pode ser recolhido para o recipiente de produto, P, ou de impurezas, W. É de salientar que esta remoção é feita na totalidade do caudal volumétrico e por frações de tempo. Recorrendo ao exemplo anterior, de modo a completar o percurso do líquido que entra na coluna 1, assumimos que a válvula adjacente à corrente C30 está "aberta" (consequentemente as válvulas das correntes C33, C27 e C38 necessitam de estar "fechadas" de modo a direcionar o fluido para a corrente C30). Deste modo o líquido passa pela bomba de alimentação, passa pela corrente C1, segue para a corrente C3, passa pela coluna 1, e quando sai da coluna 1 segue pelas correntes C20, C23 e C24. No conector o líquido é direcionado para a corrente C30 pelo que segue para o recipiente de produto, onde é recolhido.

3.1.5 Circuito entre colunas

Retomando os caminhos possíveis que o líquido pode percorrer aquando da saída da coluna, vamos agora explorar a possibilidade deste ser reciclado, seguindo para a próxima coluna. O objetivo do sistema reside na recirculação da fração impura em vez de ser descartada, pelo que pode ser enviada para qualquer coluna. Normalmente, a mistura proveniente da coluna anterior é também misturada com uma solução "fresca", no entanto esta atuação depende do planeamento do sistema. Retomando ao exemplo e recorrendo agora ao caso em que a corrente de alimentação entra na coluna 3 e a válvula adjacente à corrente C40 está aberta (as válvulas das correntes C28, C32 e C35 necessitam de estar "fechadas"). Neste caso a corrente sai da coluna 3 passando pelas correntes C22, C26, chegando à bifurcação onde pode seguir vários caminhos no entanto segue pela corrente C40 que irá levar ao conector A6 onde esta corrente pode ser misturada e é alimentada à coluna 1 (abrindo a válvula da corrente C17).

3.1.6 By-pass de colunas

A última possibilidade existente aquando da saída do fluido da coluna, consiste igualmente no reciclo da mistura, no entanto este reciclo pode ter como destino qualquer uma das restantes colunas. Esta funcionalidade é ótima se alguma das colunas estiver em fase de limpeza ou no caso de não ser necessária a passagem por três colunas para a purificação da solução. Em termos de flexibilidade, este processo demonstra vantagem em relação

àqueles previamente revistos no capítulo de revisão bibliográfica, uma vez que o sistema pode receber misturas com características diferentes, isto é, que tenham maior ou menor necessidade de separação conforme as zonas de interceção entre o produto e as impurezas. É conciliado o processo de MCSGP de 3 e o de 2 colunas. De modo análogo aos pontos anteriormente apresentados, irá ser demonstrado o fluxo do líquido, fazendo uso desta funcionalidade. Neste exemplo vamos supor que a mistura proveniente da coluna 1 é enviada para a entrada da coluna 3 e a saída desta é enviada para produto. Respeitando a condição anterior, o caudal de fluido segue pelas correntes C17 onde é alimentado à coluna 1, seguidamente sai da coluna 1 por via da corrente C20, segue pela C23 e 24 e no conector A9 o fluido é direcionado para a corrente C27 (fechando as válvulas das correntes C30, C33 e C38). A corrente C27 constitui um *by-pass* à coluna 2 pelo que vai diretamente para o conector A8 e depois para a corrente C19 que constitui a entrada da coluna 3, aquando da saída a válvula C32 está aberta e o líquido é encaminhado para o recipiente de recolha de Produto.

3.1.7 Leitura UV

As células UV servem para a análise da concentração das correntes, que é feita através da absorvância recorrendo a um espetrofotometro. Deste modo podemos realizar experiências de modo a analisar da interação sólido-líquido, de várias misturas. Pode também ser realizada a validação experimental, de modo a observar a correspondência entre a simulação e a realidade. Recorrendo ao UV1, é também possível a análise das correntes, sem que estas passem pela coluna, para tal é necessário abrir a válvula da corrente C16 e fechar a válvula da corrente C17.

A versão, desenvolvida até à data, referente ao *flowsheet* do processo, está representada na figura 3.1.

3.2 Materiais

O sistema é composto, em termos de colunas, por três colunas com dimensões de 1x10 cm de aço inoxidável empacotadas com uma resina de Kromasil C18.

- O enchimento de Kromasil C18 é composto por uma base esférica de sílicas revestida com hidrocarbonetos compostos por cadeias de 18 átomos de carbono. Este enchimento, devido às propriedades químicas das cadeias acopladas, é altamente hidrofóbico, tendo um tamanho de poro de 100 Å.
- A combinação do elevado volume de poros e da área superficial juntamente com a excelente estabilidade mecânica e química, tornam o Kromasil uma resina ideal para a separação de uma grande variedade de substâncias, especialmente substâncias que requerem um elevado grau de pureza, como é o caso dos peptídeos e proteínas que são utilizados como fármacos [33].

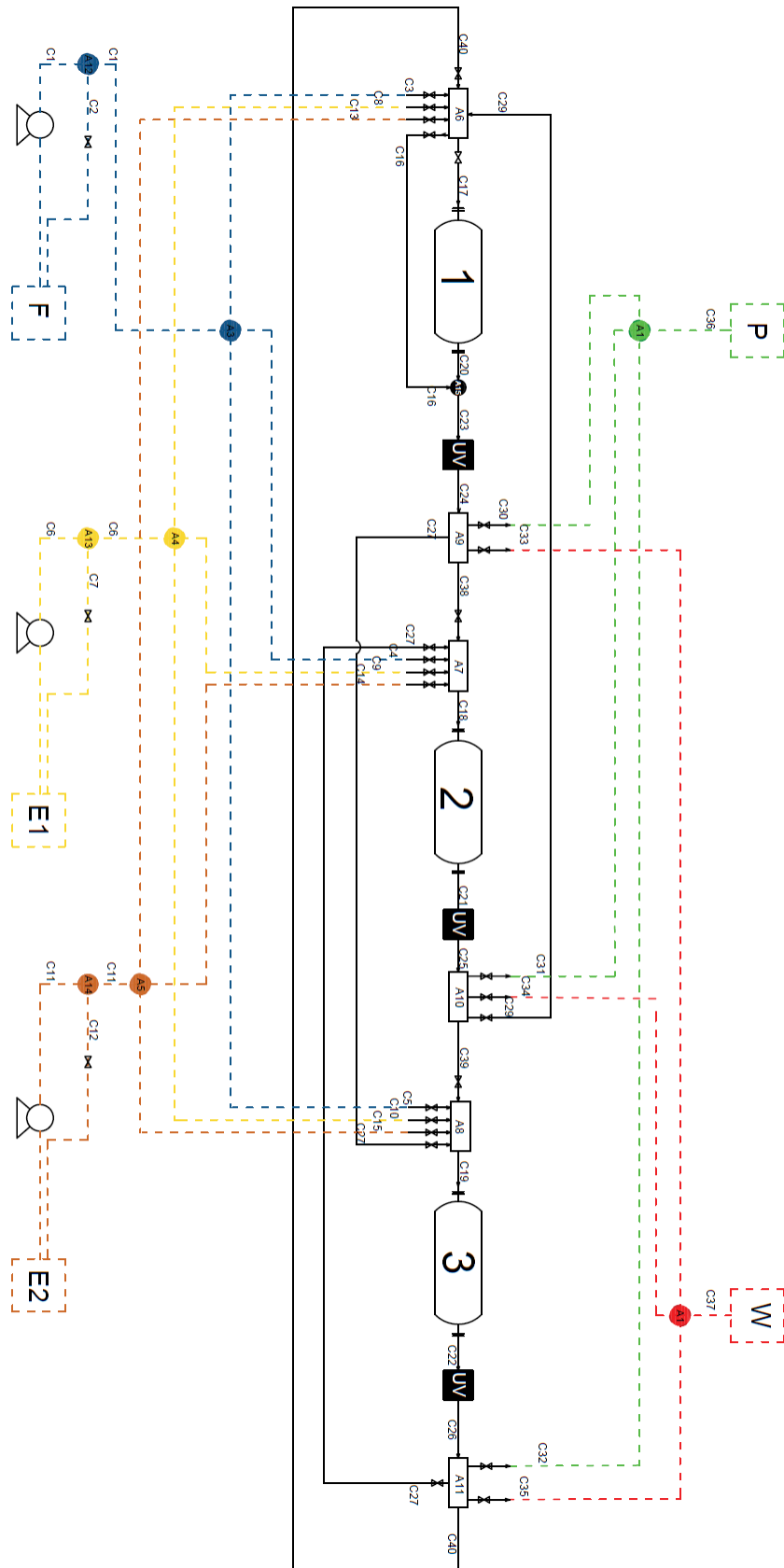


Figura 3.1: Flowsheet do processo desenvolvido

- As interações iônicas entre os peptídeos e os grupos residuais de silanol, presentes na maioria dos enchimentos, produzem um pico com cauda, o que é indesejável. Para evitar o sucedido, o Kromasil é submetido a um processo de *end-capping*, que elimina estes grupos residuais de silanol, diminuindo portanto o efeito de *tailing* [33] [34].

Através da caracterização das colunas dois e três podemos ainda inferir que a porosidade total da coluna 2 é de 74% e 73% para a coluna 3. Em termos de porosidade externa a coluna 2 apresenta o valor de 34% e a coluna 3 de 37%. Os dados e análise referentes à caracterização das colunas serão explicitados na secção 6.2. A coluna 1 não foi caracterizada devido à dificuldade na ligação entre a bomba, a coluna e a célula UV.

As válvulas utilizadas no sistema são do tipo ON/OFF, ou seja, permitem apenas a passagem ou não do líquido. As válvulas utilizadas são do modelo SFVO da Valco International, com atuação pneumática, ou seja, a aplicação de uma certa pressão “abre” a válvula (esta pressão é fornecida à válvula por meio de um sistema de ar comprimido). Globalmente falando foram utilizadas 26 válvulas.

Em termos de monitorização da solução por espectrofotometria são necessários:

- Fonte luminosa que emite um feixe de luz com intensidade constante que é direcionado para o sensor de UV por meio de um cabo de fibra ótica. A fonte luminosa é do tipo DH-2000-S-DUV.
- Sensor UV que recebe, numa das extremidades a luz de intensidade constante, direcionada esta luz fazendo-a passar pela solução e emite a luz resultante para o espectrofotómetro, por meio de um cabo de fibra ótica.
- Espectrofotómetro que recebe a luz proveniente da célula UV e mede a intensidade da luz. Este detetor funciona a vários comprimentos de ondas sendo que o modelo é o USB2000 da Ocean Optics, com atenuador.

Referentemente às bombas, como anteriormente referido foram utilizadas duas bombas distintas, uma isocrática e outra não-isocrática. Como bomba isocrática foi utilizado o modelo K501 da Knauer, com uma cabeça de 10ml. Por outro lado, para a bomba não isocrática foi usado o modelo S-1050, sem câmara de mistura. Ambas as bombas estão conectadas ao computador por via RS232.

Em termos de capilares, os utilizados são próprios para aguentar altas pressões, uma vez que são de HPLC. Percentualmente a diferença entre diâmetro interno e externo é elevada, o que os torna resistentes a elevadas pressões. Em relação ao volume morto, este deve ser reduzido ao máximo, através da redução do comprimento dos capilares utilizados. No entanto, deve ser estabelecido um equilíbrio relativamente ao comprimento dos capilares, ou seja, um equilíbrio entre o volume morto e a funcionalidade do sistema. A figura 3.2 demonstra o objetivo para esta montagem da instalação em termos de distribuição dos materiais e secções.

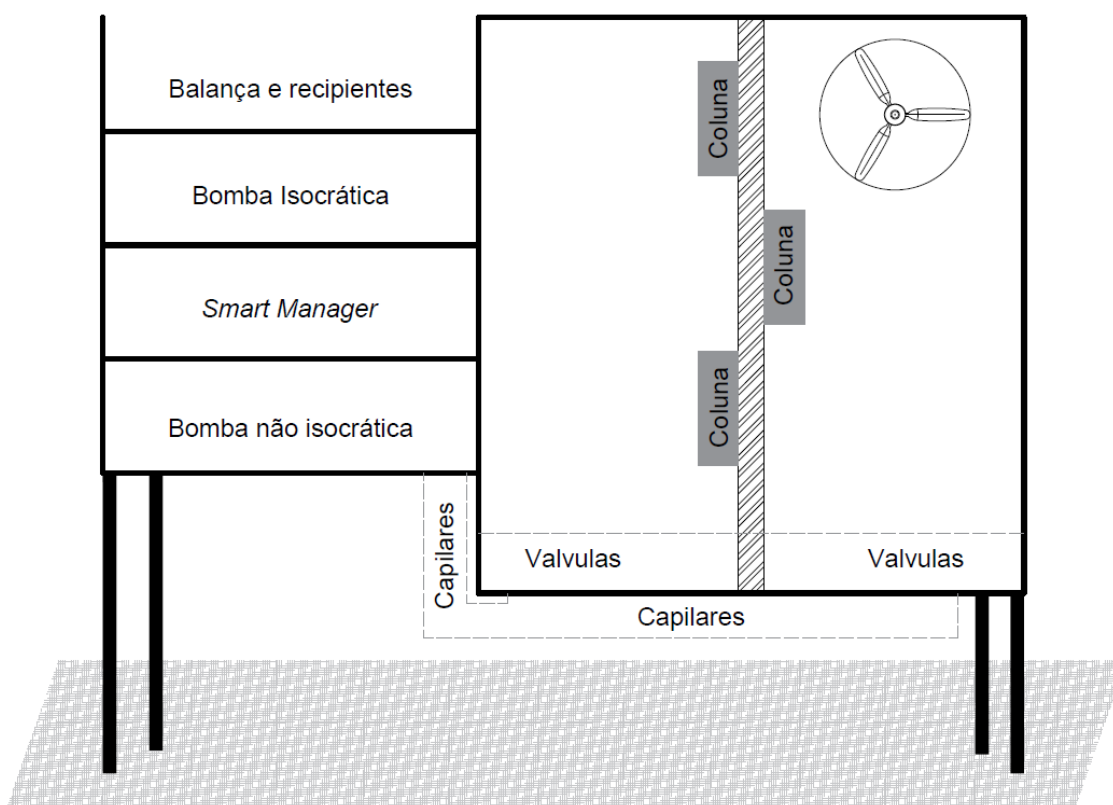


Figura 3.2: Estrutura física da instalação

Analisando a figura 3.2 vemos que, no canto superior esquerdo, estão dispostas as válvulas responsáveis pelo sistema de reciclo do líquido. No lado esquerdo, estão os equipamentos que não necessitam de estar a uma temperatura controlada, como é o caso das bombas e das balanças (idealmente os recipientes deveriam estar a uma temperatura controlada, no entanto devem estar próximos das bombas). No lado direito, estamos perante um sistema fechado, uma vez que a temperatura deve ser controlada, atuando no grau de refrigeração do sistema, através de uma ventoinha presente no sistema. Relativamente a este sistema: As colunas, idealmente, estão presas num cilindro que se situa no centro; As válvulas (sem ser as de reciclo) serão colocadas num suporte próprio, que se encontra nas extremidades inferiores; Os capilares que transportam o líquido da parte esquerda da instalação para o interior do sistema, são passados sob o tabuleiro do sistema, passando através de cavidades para o seu interior.

3.3 Comunicação com o sistema

Como foi referido anteriormente no enquadramento, é extremamente benéfica a utilização de um sistema automatizado. Como não poderia deixar de ser, perante um sistema destes, que é extremamente preciso, foi desenvolvido um método de comunicação entre o computador e o sistema. Este programa, *ChromatographyStudio*, permite a comunicação com vários elementos do sistema, tendo sido escrito na linguagem de programação *Julia*.

O desenvolvimento deste sistema foi realizado pelo grupo de investigação do Professor José Paulo Mota. Este *software* foi utilizado, no presente trabalho, na monitorização de experiências para averiguar a correta montagem do sistema e para a realização de algumas experiências.

Atualmente a comunicação entre o computador e o sistema permite:

- Abrir e fechar válvulas;
- Controlar parâmetros de funcionamento das bombas;
- Monitorizar os dados fornecidos pelo espectrómetro.

Em termos de controlo e comunicação com a bomba isocrática, é possível definir o caudal. Por outro lado, é também possível controlar a bomba de gradiente, havendo múltiplas possibilidades. É possível definir o nível de mistura de cada componente, ou seja, a percentagem volumétrica de cada composto presente na mistura, assim como definir, percentualmente, as concentrações inicial e final dos vários compostos, assim como o tempo desta variação.

Para ambas as bombas, podem ser criados programas que permitem o planeamento das experiências, em que podem ser definidos tanto a duração de cada passo como os vários passos.

MODELO MATEMÁTICO

4.1 Balanço mássico

De modo a descrever, o perfil de concentração do fluido ao longo da coluna cromatográfica é necessário estabelecer, matematicamente, o balanço mássico. É necessário definir os fluxos das correntes de entrada e saída, assim como o termo de acumulação. Estas relações estão definidas nas equações 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente.

Relativamente aos termos de entrada e saída temos de ter em conta o termo de dispersão axial, D_L , que reflete a dispersão axial existente, conduzindo ao consequente atraso da solução, em termos de concentração. O termo de entrada é constituído pelo fluxo de entrada, $N_{i,z}$, e o termo de saída pelo fluxo de saída, $N_{i,z+\Delta z}$.

$$N_{i,z} = \epsilon S \left(u C_i - D_{l,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z,t} \quad (4.1)$$

$$N_{i,z+\Delta z} = \epsilon S \left(u C_i - D_{l,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z+\Delta z,t} \quad (4.2)$$

O termo geral de acumulação é constituído pois dois termos, o primeiro corresponde ao líquido fora das partículas e o segundo diz respeito ao líquido que está retido nas partículas, como está representado na equação 4.3, [23].

$$Acumulado = S \Delta z \left(\epsilon \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \epsilon) \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \right) \Big|_{z,t} \quad (4.3)$$

Em que i é o índice que se refere aos diversos componentes ($i = 0$ é o índice que denota o solvente), C é a concentração na fase líquida, C_s é a concentração na fase sólida, ϵ é a porosidade do leito, t refere-se às coordenadas de tempo, z à coordenada referente ao comprimento da coluna, D_L o coeficiente de dispersão axial, u a velocidade intersticial do líquido e por fim, S que é a área da secção reta (unidades de comprimento²).

A equação 4.5 corresponde à equação geral de balanço de massa para uma coluna cromatográfica, que descreve, em termos de concentração, o fluxo dos vários compostos ao longo da coluna. Analisando agora a equação, vemos que os primeiros dois termos são referentes à acumulação, tanto na fase móvel como na fase estacionária, respetivamente. O terceiro termo diz respeito à transferência de massa por convecção e, no lado direito da igualdade, o termo é referente ao efeito de dispersão axial.

De modo a proceder ao balanço de massa é necessário agregar as várias equações acima apresentadas, respeitando a equação 4.4 de balanço de massa geral, através da relação entre variáveis e considerando um elemento infinitesimal de comprimento ($z \rightarrow 0$).

$$Entra = Sai + Acumulado \quad (4.4)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{l,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (4.5)$$

Na elaboração do balanço mássico são assumidas algumas condições que permitem a simplificação das condições de entrada, saída e adsorção [23]. É então considerado que:

- A dispersão axial é constante ao longo da coluna;
- A velocidade é constante ao longo da coluna;
- O fator de dispersão axial é constante em todo o comprimento da coluna;
- O fator de compressibilidade é nulo;
- O volume molar das substâncias é o mesmo em ambas as fases da coluna;
- Não há efeitos térmicos (energia de adsorção é considerada 0) e consequentes fatores associado à variação de temperatura no sistema, tanto em termos de adsorção como em termos de mobilidade;
- A coluna está sob condições operatórias constantes.

4.2 Condições Iniciais

É necessário definir os parâmetros para o início do processo, isto é, para $t=0$.

No caso da cromatografia, inicialmente a coluna não contém as substâncias alvo de separação. A concentração destas espécies na corrente de alimentação (sem contar com o solvente, em que $i=0$) é nula, como mostrado na equação 4.6.

$$C_i \Big|_{z,t=0} = 0 \quad (4.6)$$

Por outro lado, é também necessário definir a concentração inicial de solvente. Inicialmente, a fase móvel é composta pelo solvente de dessorção. Deste modo, a concentração desta substância, C_0 , é equivalente à concentração da solução alimentada, C_0^{in} . Esta relação é explicitada na equação 4.7.

$$C_0|_{z,t=0} = C_0^{in} \quad (4.7)$$

Ambas as equações apresentadas são válidas para o domínio de $0 < z < L$, sendo que para $z = 0$ e $z = L$ existem descontinuidades. Nestes pontos de descontinuidade, são necessárias condições fronteira para descrever estas zonas, de modo a completar o resto do domínio.

4.3 Condições Fronteira

As condições fronteira partem do principio que na parcela infinitesimal entre 0^- e 0^+ não existe dispersão, pelo que a equação elementar desta zona é:

$$N_{i,0^-} = N_{i,0^+} \quad (4.8)$$

Resolvendo esta equação com base nas equações 4.1 e 4.2 considerando o fluxo para 0^+ , chegamos à equação 4.9

$$uC_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=0} = C_i^{in} \quad (4.9)$$

Por outro lado, no final da coluna, a concentração é contínua e não há variação na concentração. Em termos matemáticos obtemos a equação 4.10.

$$\frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=L} = 0 \quad (4.10)$$

As equações 4.9 e 4.10 são as condições fronteira de Danckwerts [35]. Foram consideradas estas equações pois, embora existam várias condições fronteira, as de Danckwerts são as mais realistas, uma vez que consideram a continuidade do sistema contrariamente a alterações em pulso [36].

4.4 Dispersão Axial

O termo que contempla a dispersão axial, D_l , é muitas vezes relacionado com a altura equivalente de um prato teórico, H_l , que é diferente consoante o composto considerado. Esta relação é demonstrada sob a forma matemática na equação 4.11 [36].

$$D_{l,i} = \frac{H_{l,i}L}{2t_0} = \frac{H_{l,i}u}{2} \quad (4.11)$$

Em que t_0 é o tempo de *hold-up* da coluna, $t_0 = \frac{L}{u}$.

Por sua vez, a altura equivalente do prato teórico está relacionada com as restrições difusionais, pelo que é comum relacionar este termo com um termo que exprime estas restrições difusionais, o Peclet. O Peclet hidrodinâmico, Pe , é um numero adimensional que compreende o rácio entre dois modos de transporte, a convecção e difusão [35]. A relação entre Pe e H_l é dada pela equação 4.12.

$$Pe = \frac{uL}{D_L} = \frac{2L}{H_l} \quad (4.12)$$

Adicionalmente, é possível obter uma altura de prato adimensional, h_l , em que $h_l = \frac{H_l}{L}$. Obtendo o número de Peclet em função da altura adimensional do prato teórico, equação 4.13.

$$Pe = \frac{uL}{D_L} = \frac{2}{h_l} \quad (4.13)$$

4.5 Adsorção

A adsorção é um fenómeno de agregação de moléculas numa superfície sólida, que leva à transferência de uma molécula entre o fluido e a superfície do sólido. Na maioria dos casos este processo é descrito, aquando do equilíbrio da transferência do composto, por meio de equações que quantificam a quantidade de substância presente no sólido em função da concentração do mesmo componente no fluido. Estas equações são as isotérmicas, no entanto estas dependem também das várias cinéticas presentes no processo de adsorção [37].

4.5.1 Isotérmica

A isotérmica de adsorção de um composto reflete a quantidade de massa adsorvida por volume de sólido em função da concentração total do composto no líquido, isto é, que foi alimentada ao sistema. A descrição das isotérmicas é um tema muito vasto pelo que vai apenas ser abordado de uma maneira pouco aprofundada.

Normalmente, quando a concentração total do componente presente no sistema aumenta a quantidade adsorvida é também incrementada. No entanto, esta subida pode não ser linear, podendo ser do tipo de Langmuir ou anti-Langmuir, como podemos observar na figura 4.1.

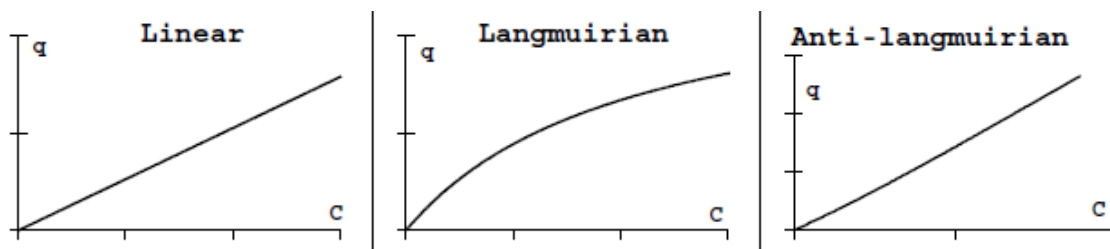


Figura 4.1: Representação gráfica de vários tipos de Isotérmica. A isotérmica de Langmuir tem um carácter logarítmico enquanto que a isotérmica de anti-langmuir exhibe o comportamento contrário, ou seja, exponencial [36].

4.5.2 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção contempla, como próprio nome indica, as várias cinéticas no processo de adsorção. A cinética global de adsorção reflete a taxa de transferência de massa entre o líquido e o sólido, explicitando a concentração de componente presente no sólido.

No caso da cromatografia de afinidade, mais concretamente da separação de peptídeos formados por longas cadeias, a transferência de massa é bem aproximada a uma cinética linear de transferência de massa entre o líquido e o sólido, uma vez que a velocidade de transferência de massa é baixa. A concentração de componente na fase sólida ao longo do tempo é dada pela equação 4.14, pelo que a função g depende da isotérmica que por sua vez contempla a cinética da transferência de massa, exceptuando o caso em que se considera um modelo de equilíbrio. A função contempla também as velocidades de adsorção e dessorção, que por sua vez dependem das concentrações dos compostos no líquido e no sólido assim como a concentração do solvente [36].

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = g_i(C_1, \dots, C_i, C_0, C_{s,1}, \dots, C_{s,i}) \quad (4.14)$$

A cinética de adsorção trata-se de um balanço entre a adsorção e a dessorção cuja variação de massa no sólido, ao longo no tempo, corresponde à diferença entre a (1) massa adsorvida e a (2) massa dessorvida [36].

(1) A massa adsorvida ao longo do tempo é proporcional a uma constante de adsorção, K_a , e depende, tanto da disponibilidade de adsorção por parte do adsorvente, como da concentração do composto no líquido.

(2) A massa dessorvida ao longo do tempo é proporcional à massa adsorvida, em que a razão de dessorção é dada por K_d .

Quando temos uma maior concentração do composto quer dizer que temos um maior numero de moléculas disponível para o local de adsorção e probabilisticamente falando é mais fácil que as moléculas sejam adsorvidas. Para uma adsorção linear, a quantidade de massa adsorvida é igual a uma constante de adsorção multiplicada pela concentração de massa presente no líquido.

Este balanço é verificado na equação 4.14, em que o primeiro termo diz respeito à adsorção, que por sua vez depende de uma constante de adsorção, K_a , e contrariamente, uma termo de dessorção que é proporcional à constante de dessorção, K_d .

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_a(q_{s,i} - C_{s,i}) - k_d C_{s,i} \quad (4.15)$$

O conjunto de equações apresentadas neste capítulo têm a função de descrever, em termos de concentração, a composição da corrente ao longo duma coluna cromatográfica. Primeiramente foi apresentado o balanço mássico e, em seguida, o termo de adsorção.

MODELO E SIMULAÇÃO

O objetivo do capítulo consiste na apresentação e explicação dos modelos matemáticos relativos ao sistema, assim como a integração destes de modo a realização a simulação do sistema. Uma vez que o sistema não está totalmente desenvolvido, foi realizado um *case study* de um dos sistema revistos no capítulo 2, que é utilizado para a separação de misturas de peptídeos em semi-contínuo, o GSSR.

5.1 Descrição dos modelos

As diferentes equações matemáticas que regem o sistema, apresentadas anteriormente, têm de ser relacionadas entre si. Adicionalmente, em termos matemáticos, algumas das equações são de difícil resolução, especialmente a equação 5.18, que é uma equação diferencial parcial de segunda ordem. Através da simulação é ainda possível obter todo o perfil de concentração ao longo do tempo e espaço dos vários componentes. Deste modo foi utilizado o programa *gPROMS*, que resolve estes sistemas.

Primeiramente, foi realizado código em *gPROMS* referente às várias partes integrantes do sistema de modo a explicitar o processo. Deste modo foram construídos os seguintes modelos:

1. **Coluna.** Descreve a variação de concentração ao longo da coluna.
2. **Entradas e saídas.** Indica como se processam as entradas e saídas da coluna, tanto em termos de concentração como de caudal.
3. **Ligação entre colunas.** Reflete o modo como é feita a ligação entre colunas, em termos de concentração e volume, ou seja, a relação entre três modelos do tipo 2.

5.1.1 Coluna

De modo a simular a variação de concentração ao longo da coluna, foi realizado um modelo onde foram inseridas as equações 4.5, 4.9, 4.10, 4.6, 4.7, interligadas entre elas. É também necessário definir as variáveis e as constantes necessárias.

A coordenada axial foi definida separando o comprimento total em várias partes. É ainda importante definir as posições de entrada e saída, uma vez que são locais onde são inseridas descontinuidades e onde as equações fronteira são aplicáveis.

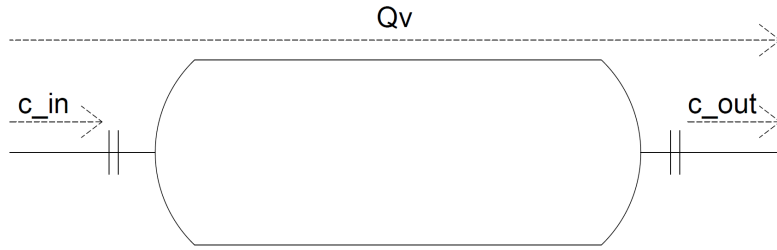


Figura 5.1: Modelo referente à coluna cromatográfica. Este modelo descreve a variação da concentração ao longo do espaço e tempo

Em termos de dados fornecidos (input) temos a concentração de entrada, c_{in} , e o caudal volumétrico, Qv . Por outro lado, temos os dados que são obtidos através dos restantes modelos que é o caso da concentração de saída c_{out} .

5.1.2 Entradas e Saídas

Este modelo explicita as relações que definem o sistema em termos de volume e concentração das entradas e saídas.

Explicando, cada coluna tem (1) uma corrente de alimentação e (2) uma corrente de saída.

(1) A corrente de entrada da coluna, Qv_j^{in} , resulta da conjugação de várias correntes. A corrente de entrada compreende as correntes de saída das restantes colunas, Qv_j^{prev} , alimentação, Qv_j^F , e os vários eluente, $Qv_j^{E_n}$ (em que E indica que é um solvente e o índice n o tipo). A equação 5.1 reflete esta relação.

$$Qv_j^{in} = Qv_j^{prev} + Qv_j^F + \sum_{E_n=0}^{Ns} Qv_j^{E_n} \quad (5.1)$$

O índice inferior, j , denota o numero coluna, o índice superior, corresponde à corrente, em que in é a corrente de entrada, F a alimentação e, E_n os solventes utilizados.

Alem do balanço volumétrico, é necessário realizar o balanço mássico, em que o principio adjacente é que, a massa de entrada tem de ser igual à massa de saída. Este balanço é realizado em separado para os componentes presentes na alimentação e para o composto responsável pela dessorção ($i=1:5$). A equação 5.2 é referente ao balanço de massa do

composto a separar e a equação 5.2 corresponde ao balanço mássico ao composto para dessorção.

$$Qv_j^F C_{i,j}^F + Qv_j^{prev} C_{i,j}^{prev} = Qv_j^{in} C_{i,j}^{in} \quad (5.2)$$

$$Qv_{j,EtOH}^{in} c_{j,EtOH}^{in} = \sum_{E_n=0}^{Ns} Qv^{E_n} \times c_{EtOH,j}^{E_n} + Qv^{prev} c_{EtOH,j}^{prev} \quad (5.3)$$

(2) Por outro lado, a corrente de saída que é igual, em termos de caudal, à corrente de entrada, divide-se em várias corrente. A corrente proveniente da coluna, Qv^{in} , pode dar origem à corrente de produto, Qv^P , de resíduo, Qv^W , e a própria corrente de saída, Qv^{out} . Contrariamente à corrente de entrada, a corrente de saída não necessita de um balanço mássico, uma vez que as correntes, que dela degeneram têm todas a mesma concentração, sendo apenas necessário estabelecer o balanço volumétrico, que está representado na equação 5.4.

$$Qv_j^{out} = Qv_j^{in} - Qv_j^P + Qv_j^W \quad (5.4)$$

Estas correntes, são controladas por válvulas, $v_{coluna}^{corrente}$, e estas têm um carácter binário ou seja, quando a válvula está fechada o líquido não passa, no entanto, quando a válvula está aberta o líquido continua o seu percurso normal. Esta condição é estabelecida através das equações 5.5 a 5.8. No caso das correntes de entrada de solvente, estas podem estar "abertas" caso sejam alimentadas ao sistema ou "fechadas" quando não são inseridas no sistema. Por outro lado, a corrente de saída tem vários "caminhos" possíveis que são definidos consoante a posição da válvula. Como estas válvulas derivam da mesma corrente elas estão dependentes umas das outras, pelo que, pode apenas estar uma válvula aberta em simultâneo.

$$Qv_j^P = Qv_j^{in} \times v_j^P \quad (5.5)$$

$$Qv_j^W = Qv_j^{in} \times v_j^W \quad (5.6)$$

$$Qv_j^F = Qv_j^{F,in} \times v_j^F \quad (5.7)$$

$$Qv_j^{E_n} = Qv_j^{E_n,in} \times v_j^{E_n} \quad (5.8)$$

Em que o líquido antes da válvula é $Qv^{corrente,in}$ e depois da válvula é $Qv^{corrente}$

A posição destas válvulas muda ao longo do tempo e é controlada consoante os passos que são pretendidos, pelo que estas são definidas na parte da calendarização (*Schedule* em inglês).

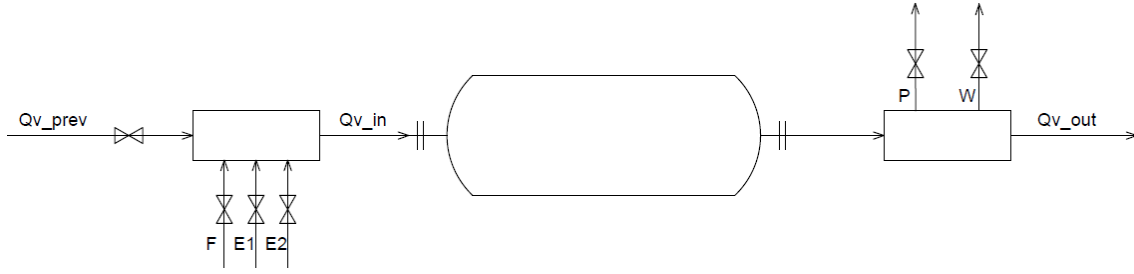


Figura 5.2: Esquema do modelo referente às entradas e saídas da coluna. O modelo explicita as relações das correntes que convergem no conector antes da coluna e das correntes que divergem do conector depois da coluna. As relações são realizadas a nível de balanços de caudal e de massa.

5.1.3 Ligação entre colunas

A função deste modelo é de relacionar as variáveis das diferentes colunas. Anteriormente, no modelo que define as correntes de entrada e saída é explicitado o cálculo das correntes. No entanto, é necessário definir a conexão entre as várias colunas de modo a estabelecer a relação entre as variáveis que entram nos cálculos do modelo anterior. Em termos de representação gráfica, o modelo é transcrito a figura 5.3.

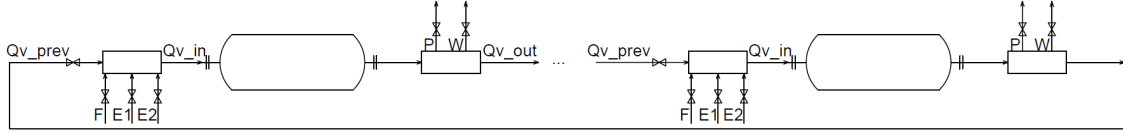


Figura 5.3: Modelo de ligação entre colunas. Este modelo faz uso dos vários modelos anteriormente utilizados. No entanto, o objetivo é o de estabelecer a relação entre as várias colunas, ou seja, definir as correntes representadas por Qv_{prev} através do uso das correntes de Qv_{out} .

Mais concretamente, uma das parcelas de entrada na coluna é proveniente das outras colunas. A corrente, $Prev$, corresponde à soma das correntes de saída das outras colunas. Em termos de caudal, esta relação é descrita pelas equações 5.9 a 5.11.

$$Qv_1^{prev} = Qv_3^{out} + Qv_2^{out} \quad (5.9)$$

$$Qv_2^{prev} = Qv_1^{out} + Qv_3^{out} \quad (5.10)$$

$$Qv_3^{prev} = Qv_2^{out} + Qv_1^{out} \quad (5.11)$$

$$Qv_1^{prev} C_{i,1}^{prev} = Qv_3^{out} C_{i,3}^{out} + Qv_2^{out} C_{i,2}^{out} \quad (5.12)$$

$$Qv_2^{prev} C_{i,2}^{prev} = Qv_1^{out} C_{i,1}^{out} + Qv_3^{out} C_{i,3}^{out} \quad (5.13)$$

$$Qv_3^{prev} C_{i,3}^{prev} = Qv_2^{out} C_{i,2}^{out} + Qv_1^{out} C_{i,1}^{out} \quad (5.14)$$

5.1.4 Gradiente de solvente

No presente sistema é utilizado um gradiente de solvente, sendo que este é representado pela corrente de solvente E_G . Em termos de caudal, esta corrente mantém-se constante (quando é utilizada), no entanto há um gradiente de concentração. Este gradiente de concentração é linear e pode ser descrito pela equação 5.15, no entanto, é necessário estabelecer a concentração máxima, $C_{max}^{E_G}$, e a concentração mínima, $C_0^{E_G}$, sendo que o declive depende do tempo necessário para ir de uma concentração a outra, ou seja o tempo de alimentação, τ .

$$c^{E_G}(t) = c_0^{E_G} + \frac{C_{max}^{E_G} - C_0^{E_G}}{\tau} \quad (5.15)$$

5.2 Case study

De modo a testar o código escrito, foi realizado um *case study* relativamente ao sistema GSSR, em que os parâmetros utilizados são referentes ao mesmo, cujos dados estão descritos no artigo de apresentação deste sistema [32].

5.2.1 Balanço mássico da coluna

O balanço mássico à coluna do sistema de GSSR, é um pouco mais particular, relativamente àquele apresentado na equação 4.5.

Relativamente ao termo de adsorção do composto, este pode e deve ser relacionado com o gradiente de concentração da fase móvel pelo que é necessário modificar a equação, 4.15. Quanto maior a concentração de solvente, menor será a força de interação entre o composto e o sólido pelo que é necessário verificar a relação entre a isotérmica e a concentração de solvente. Adicionalmente, a isotérmica pode ser considerada linear, ou seja, a relação entre a massa adsorvida e a concentração da mistura é linear, uma vez que são alimentadas concentrações baixas dos componentes. O termo que rege a isotérmica, é a constante de Henry, H_i sendo que este termo pode ser dividido. Dentro da constante aparente de Henry temos uma verdadeira constante de Henry, H_0 , que se estabelece uma relação de proporcionalidade com a concentração do solvente, esta relação está descrita na equação 5.16.

$$H_i = \frac{H'_i}{c_0^{n_i}} \quad (5.16)$$

Em que H_i' e n_i são parâmetros obtidos por ajuste dos dados experimentais. Obtendo a constante de Henry, H_i . Analisando a equação 5.16, vemos também que a relação entre a constante de Henry e a concentração de solvente é inversamente proporcional, como é observado na realidade.

Na equação de balanço ao sistema é utilizada uma constante de Henry expressa em termos de volume da coluna, K . Esta relação é descrita pela equação 5.17 [36].

$$K_i = (1 - \epsilon_b) H_i \quad (5.17)$$

É ainda necessário introduzir um termo que reflita a influência do volume morto no perfil de concentração. A variável de volume da coluna *extra dead*, V_e , influencia o primeiro termo da equação 4.5, referente à acumulação de composto na fase líquida [32].

Por fim, juntando as equações obtidas, 4.15, 5.16, 5.17 e adimensionalizando a equação 4.5, ficamos com a equação 5.18, que contempla o modo de operação do sistema.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} \left(\epsilon + \frac{V_e}{V} \right) + K_i \left(\frac{\partial c_i}{\partial t} - \frac{n_i c_i}{c_0} \frac{\partial c_0}{\partial t} \right) = \frac{Q}{V} \left(\frac{h_i}{2} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} - \frac{\partial c_i}{\partial x} \right) \quad (5.18)$$

5.2.2 Análise do *crude mix*

A mistura de peptídeos que é alimentada ao sistema foi identificada, em termos de cromatograma, e está representada na figura 5.4. A mistura foi dividida em 5 frações:

- Composto fracamente adsorvido;
- Composto moderadamente retido que, a nível de cromatograma, está na zona de interceção com o composto-alvo, situando-se à esquerda do mesmo;
- Composto-alvo;
- Composto moderadamente retido que, a nível de cromatograma, está na zona de interceção com o composto-alvo, situando-se à direita do mesmo;
- Composto fortemente adsorvido. A separação destas frações, o cromatograma da mistura de peptídeos fornecida e as percentagens de cada fração estão representadas na figura 5.4.

5.2.3 *Schedule*

É necessário definir as variáveis de operação, com base no planeamento do processo. Os passos do processo foram estabelecidos pela *NOVAsep Process* e parâmetros de operação que vão ser explicitados, foram obtidos a partir de otimizações realizadas pelo professor José Paulo Mota .

Como variáveis manipuláveis, foram determinados e apresentados na tabela 5.1 os caudais e a concentração de solvente de cada corrente.

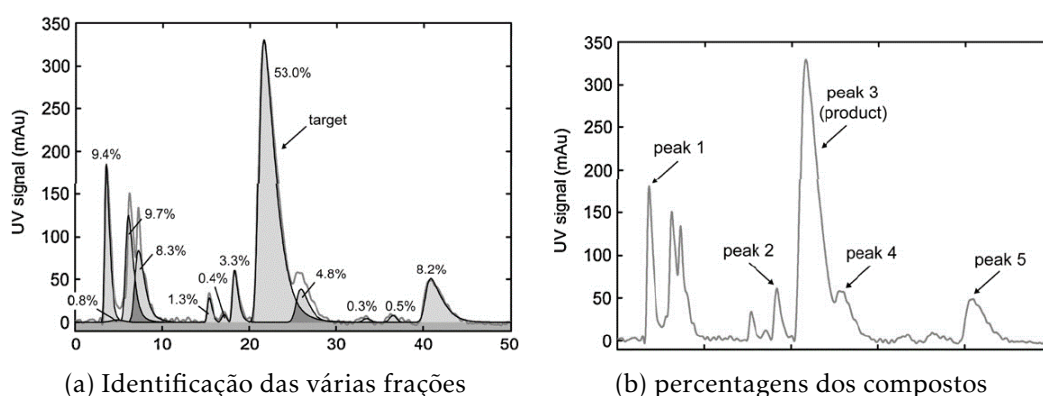


Figura 5.4: Cromatograma da mistura de peptídeos utilizada[32].

Tabela 5.1: Concentração de solvente e caudal de cada corrente [32].

Corrente	Concentração de EtOH %(v/v)	Qv (mL/min)
Alimentação	0.25	2.00
Solvente A	0.324-0.354	5.70
Solvente B	0.25	1.00
Solvente C	0.25	1.25
Solvente D	0.5	5.00

O solvente utilizado foi o etanol, pelo que os parâmetros de K e n resultam da relação entre a mistura de peptídeos e este solvente. Os valores apresentados na tabela 5.2 resultaram do tratamento de dados dos valores obtidos experimentalmente para várias experiências a várias concentrações da mistura de peptídios em etanol.

Tabela 5.2: K' e n para os vários compostos [32].

	Composto				
	1	2	3	4	5
K'	8×10^{-7}	0.016	0.016	0.018	0.017
n	8.36	3.83	4.02	4.08	4.47

Por outro lado, é também necessário definir as posições das válvulas (abertas ou fechadas) e o tempo de cada passo. As válvulas são abertas conforme a entrada de solvente em cada coluna, as ligações entre colunas e o destino da solução. A figura 5.5 mostra as entradas e saídas de cada coluna e é através desta figura que se definem as posições das válvulas.

5.2.4 Resultados e discussão

Em seguida vão ser apresentados os resultados obtidos através da simulação, sob a forma de gráfico.

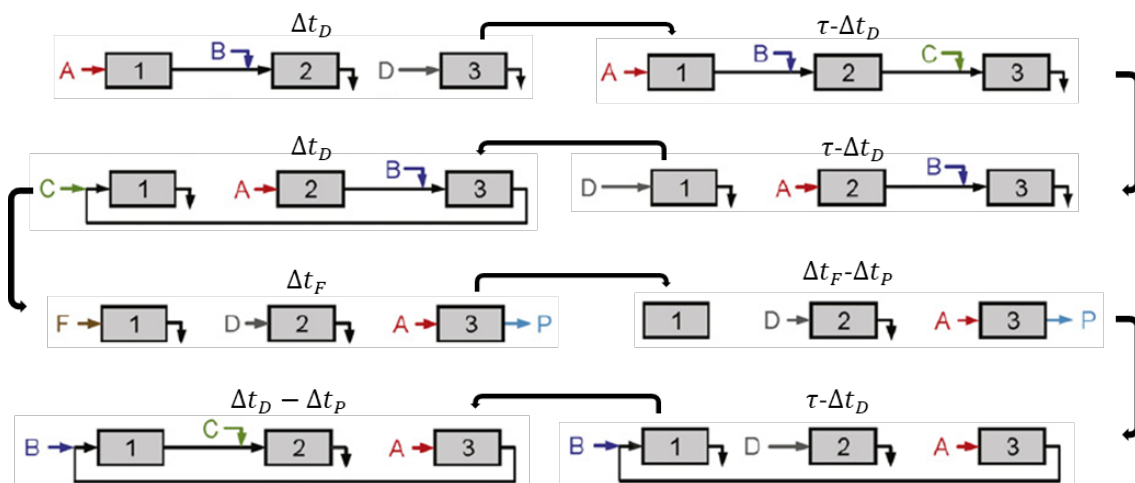


Figura 5.5: Solução das correntes de entrada e posição de saída dos vários passos de um ciclo. Adaptado de [32].

Tabela 5.3: Definição das variáveis temporais do processo [32].

Variável	τ	t_D	Δt_F	Δt_P	t_p e t_f
Tempo (min)	3.5	1.5	0.5	1.0	7.0

Primeiramente vamos observar, no gráfico da figura 5.6, relativo à concentração dos vários compostos na corrente de saída e a respetiva posição da válvula (aberta=1 ou fechada=0) da última coluna, onde é recolhido o produto periodicamente.

De modo a conhecer o funcionamento do sistema, é relevante ver o percurso de cada componente ao longo das colunas. De modo a observar esse comportamento vamos analisar os gráficos, representados nas figuras 5.7 a 5.11, que mostram a composição de cada composto nas correntes de saída das várias colunas.

Podemos reparar que o composto 1 é retirado quase na totalidade. Entre a coluna 2 e 3, a concentração do produto baixa drasticamente sendo apenas residual a composição deste composto na corrente de saída da coluna 3.

Quanto aos compostos 3 e 5, é espectável que o nível de separação não seja muito grande, uma vez que estão perto do produto-alvo, havendo uma zona de interceção. O gradiente de solvente é aplicado de modo a separar os compostos indesejados do pretendido, no entanto a sobreposição está presente na mesma. Perante a separação destes três compostos, é necessário um compromisso entre a pureza do composto-alvo, a taxa de recuperação, a produtividade e o custo inicial do sistema. Perante este equilíbrio é necessário analisar o preço de mercado do composto assim como o rendimento do processo, a margem bruta e a produtividade. Este equilíbrio foi considerado aquando da otimização dos parâmetros de operação, incluídos nas tabela 5.3 e 5.1, como tempos de extração, gradiente de solvente e caudais utilizados. A pureza do produto obtido, tal como a taxa

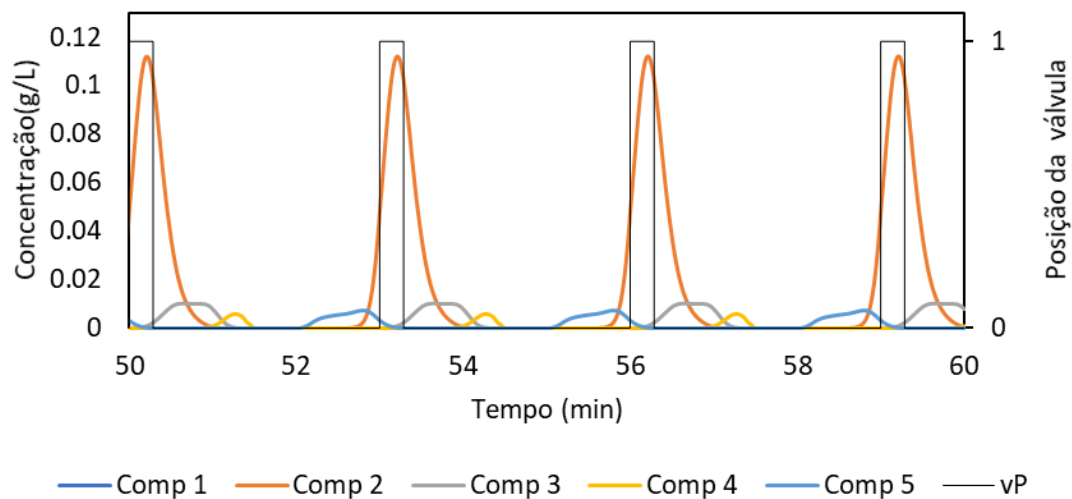


Figura 5.6: Concentração dos vários componentes na corrente de saída da última coluna ao longo do tempo.

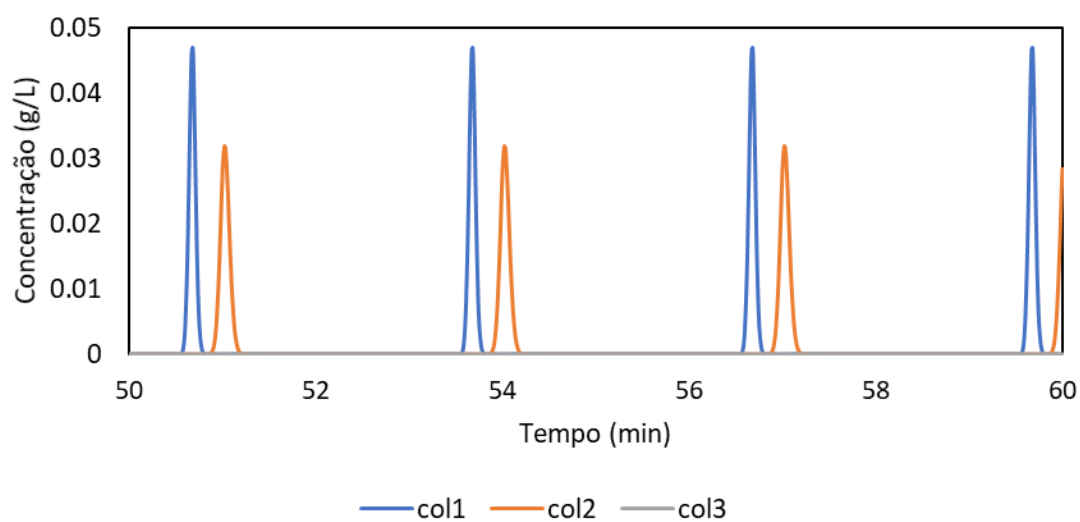


Figura 5.7: C_{out} do composto 1 nas várias colunas

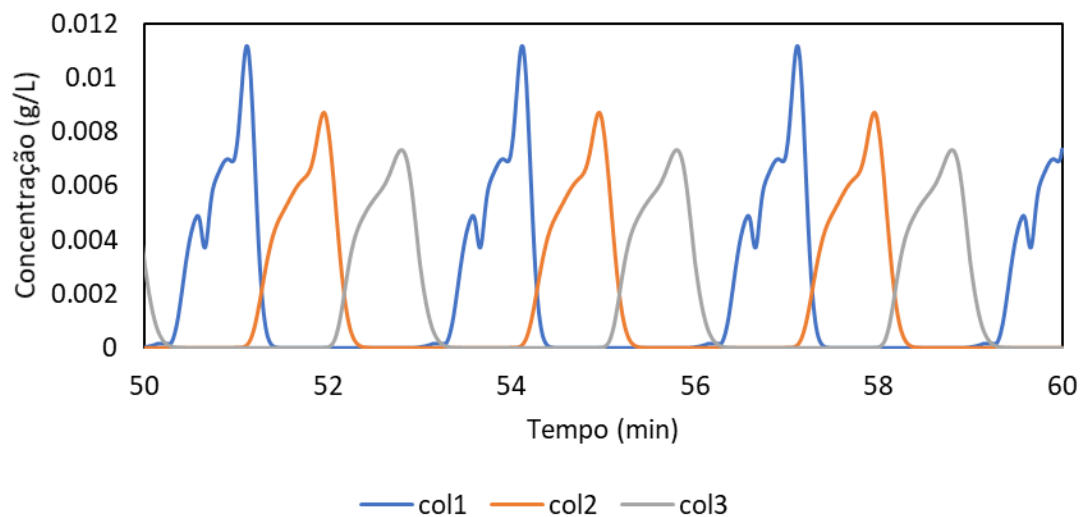


Figura 5.8: C_{out} do composto 2 nas várias colunas

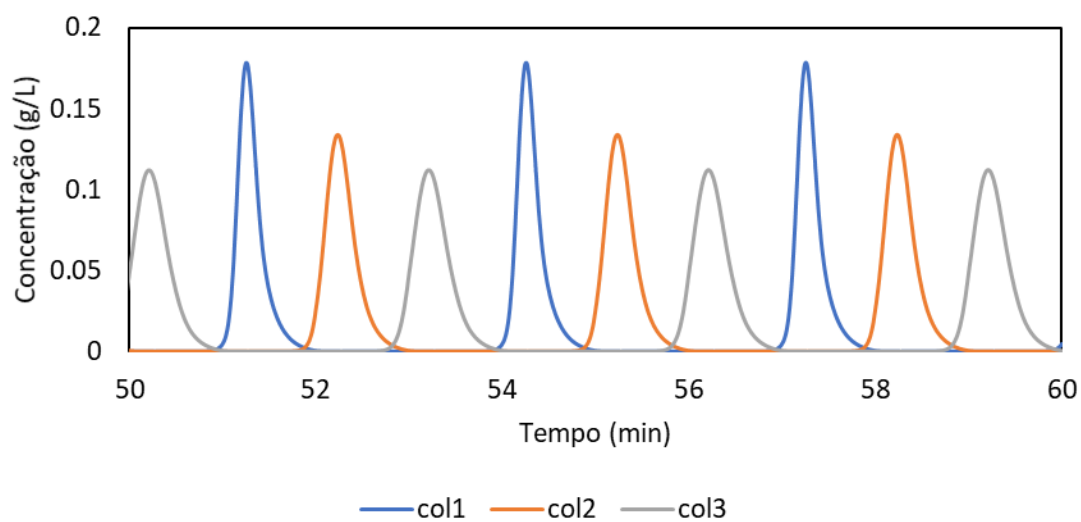
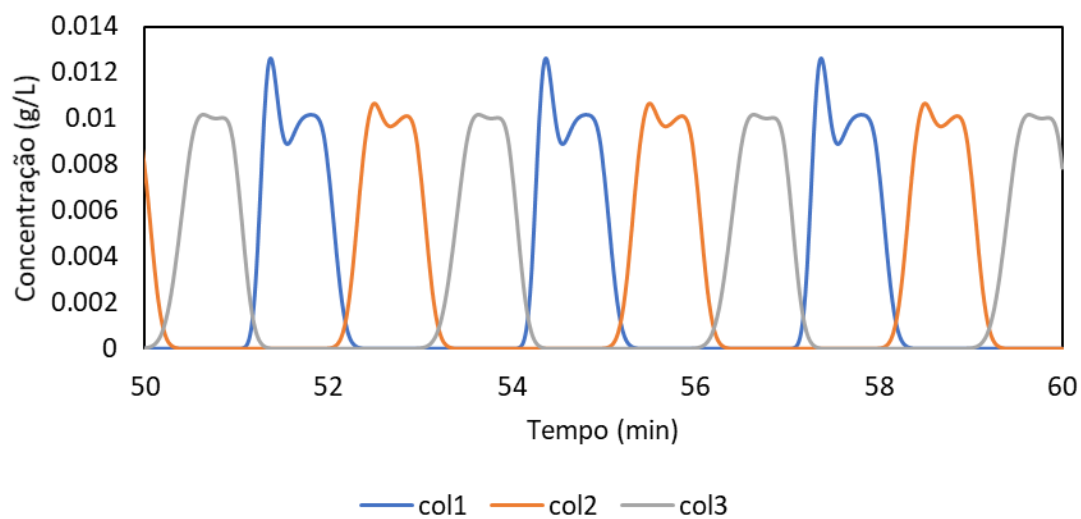
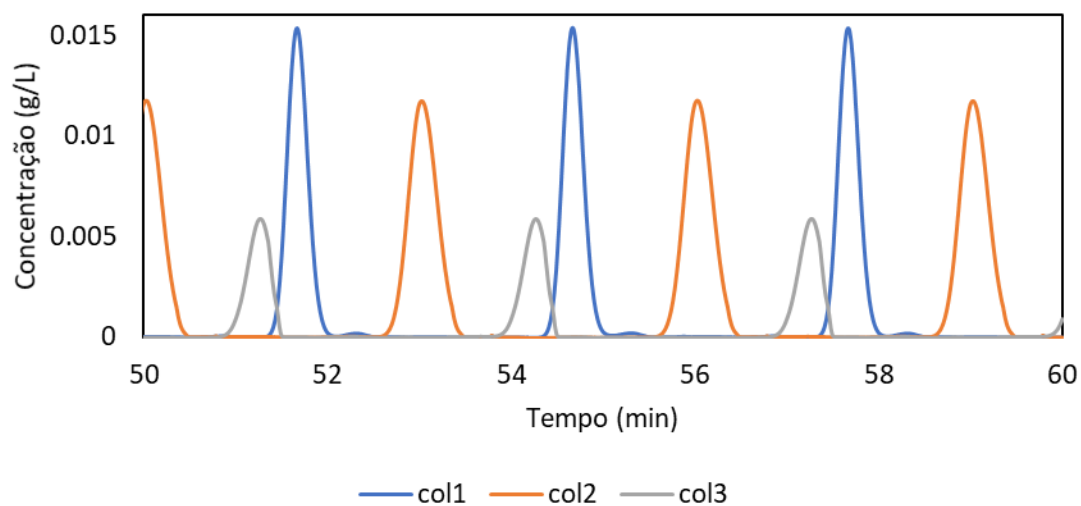


Figura 5.9: C_{out} do composto 3 nas várias colunas

Figura 5.10: C_{out} do composto 4 nas várias colunasFigura 5.11: C_{out} do composto 5 nas várias colunas

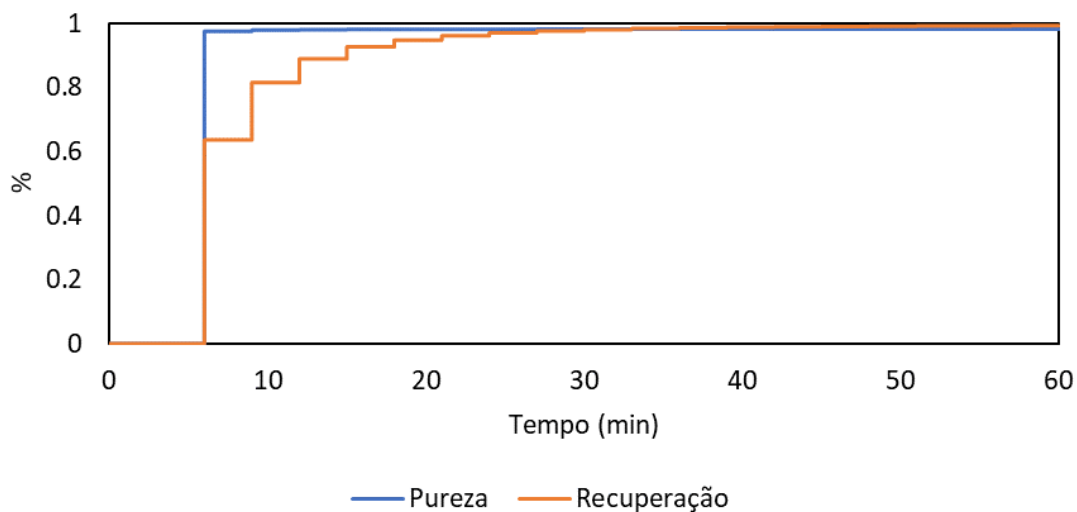


Figura 5.12: Pureza da corrente de produto e recuperação de produto ao longo do tempo

de recolha ao longo do tempo de processo, foram determinadas e estão apresentadas no gráfico da figura 5.12.

5.2.5 Conclusão

Em relação aos resultados obtidos em termos de pureza e recuperação, estes revelam ser satisfatórios. A pureza conseguida quando o sistema atinge o estado estacionário é de 98.3% e, por outro lado, a taxa de recuperação é de 99.4%, sendo que são valores obtidos para os parâmetros de operação utilizados. Em relação à pureza obtida, podemos inferir que é um valor bastante razoável para fins clínicos.

É ainda relevante realizar uma comparação entre o sistema estudado, o GSSR, com outros sistemas que servem o mesmo objetivo de separação em contínuo. No GSSR, a posição relativa das colunas é sempre a mesma, pelo que o perfil, após a estabilização do sistema, é o mesmo, sendo que cada coluna tem um objetivo específico. Por outro lado, em sistemas como o SMB ou MCSGP, a posição relativa da coluna é sempre diferente, sendo que o objetivo de cada coluna é diferente consoante o tempo.

TRABALHO EXPERIMENTAL

Para além da simulação, é relevante realizar trabalho experimental, uma vez que é necessário definir algumas variáveis do sistema.

O trabalho experimental dividiu-se em duas partes:

- Caracterização das colunas. Dentro da caracterização das colunas foram realizadas experiências de modo a obter 3 parâmetros: o volume morto, a porosidade externa e a porosidade total.
- Obtenção de isotérmicas. Para a obtenção das isotérmicas foram realizadas experiências em escada, de modo a calcular a respetiva isotérmica.

As experiências foram replicadas, no mínimo, três vezes de modo a proceder a estudo estatístico dos dados obtidos. Através das várias experiências, foi determinado o erro relativo que deverá ser menor que 10%. Deste modo, é possível demonstrar a concordância entre os dados obtidos através do erro relativo.

É ainda de referir que este trabalho experimental foi controlado e monitorizado fazendo uso do programa *ChromatographyStudio*.

6.1 Materiais

Como solvente líquido foi utilizado o etanol absoluto da Panreac.

Em termos de compostos, foram utilizados:

- Blue Dextran, cuja base de dextran tem um peso molecular de 2×10^6 Da;
- Uridina com pureza de 99%;

- Guanosina com pureza de 98%.

O produtor das substâncias sólidas é a Sigma-Aldrich.

Como equipamento, foi utilizado:

- Duas colunas cromatográficas de dimensões 1cmx10cm cuja resina é Kromasil C18;
- Cabos de aço para HPLC;
- Bomba de gradiente da Knauer, modelo S-1050.

6.2 Caracterização da coluna

Neste subcapítulo vão ser descritas as experiências para a caracterização da coluna, o tratamento de dados e a discussão dos resultados. A caracterização da coluna é fundamental, não só para o cálculo das isotérmicas, como também para trabalho futuro. Para complementar a caracterização da coluna, é necessário definir as porosidades interna e externa, pelo que foram realizadas múltiplas experiências. De modo a proceder ao cálculo das porosidades, são necessárias três etapas experimentais, de modo a determinar: (1) volume morto, (2) porosidade externa, (3) porosidade interna.

6.2.1 Volume morto

O volume morto, V_{morto} , é o volume não útil do sistema. Tudo o que não seja o volume da coluna, como capilares e conectores. O volume morto é muito simples de calcular através dos resultados experimentais e do caudal volumétrico, Qv , definido. Pela equação 6.1. vemos que é possível obter este volume obtendo experimentalmente os dados referentes ao tempo de residência da substância no sistema, $t_{sistema}$.

$$V_{morto} = Qv \times \Delta t_{sistema} \quad (6.1)$$

O tempo é calculado através da relação demonstrada na equação 6.2.

$$t_{sistema} = t_{injecao} - t_{saida} \quad (6.2)$$

Experimentalmente, o tempo de saída, t_{saida} é obtido através da monitorização por espectrofotometria da corrente de saída. Primeiramente é utilizada água destilada de modo a definir o referencial e a limpar o sistema. Em seguida é utilizada uma solução aquosa corada, utilizando blue dextran, BD, de modo a ter um sinal UV facilmente detetável (resultados sob a forma de absorvância, abs). O tempo de início de injeção, $t_{injecao}$, é conhecido uma vez que está registado no ficheiro de monitorização. Ao longo dos resultados apresentados, o tempo de injeção foi considerado nulo, sendo que os dados tiveram o início da experiência como referencial de tempo.

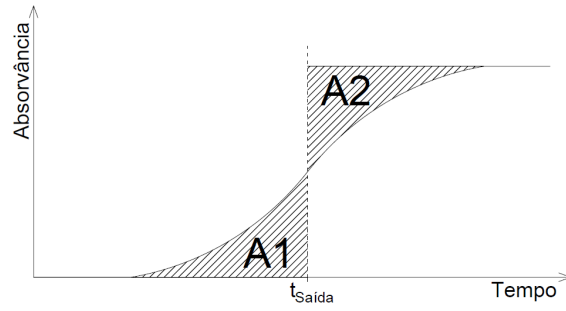


Figura 6.1: Curva de ruptura e a coordenada t_{saida} que faz com que A1 seja igual a A2. A1 é a área inferior e A2 a área superior.

No entanto, o t_{saida} não corresponde exatamente ao início de saída da solução. Como existe o efeito de dispersão do líquido, o cromatograma tem uma curva de ruptura. Para o cálculo do t_{saida} , é necessário calcular o tempo para o qual a massa de saída é igual nos dois lados da curva. A coordenada x , que faz com que para o lado esquerdo, a área inferior à linha seja equivalente à área superior à linha do lado direito da coordenada. Este método é o das Áreas iguais, em inglês EAM. A figura 6.1 representa um exemplo gráfico para o cálculo da coordenada de t_{saida} .

O cálculo das áreas é feito com base no cálculo da área dos trapézios de dois pontos consecutivos do cromatograma, da seguinte maneira:

$$A_{inferior} = \left[[abs(t_{i+1}) + abs(t_i)] - 2abs_{referencia} \right] \times \frac{t_{i+1} - t_i}{2} \quad (6.3)$$

$$A_{superior} = [2abs_{patamar} - [abs(t_{i+1}) + abs(t_i)]] \times \frac{t_{i+1} - t_i}{2} \quad (6.4)$$

Em que $abs_{referencia}$ é o valor de absorvância médio, do patamar inferior àquele que está a ser analisado e $abs_{patamar}$ é o valor de absorvância do patamar superior àquele que está a ser analisado. Por ultimo, t_i define um instante de tempo e $t_{(i+1)}$ refere-se ao instante de tempo imediatamente seguinte.

Os resultados obtidos foram transpostos para o gráfico representado na figura 6.2. Para obtenção do tempo de saída, foi analisada a curva de ruptura, utilizando os dados de início e fim da mesma. Os dados obtidos, após o tratamento de dados estão apresentados na tabela 6.1.

Este volume morto corresponde ao volume desde a saída da bomba até à célula UV. Quanto maior for este volume, maior é a mistura entre frentes de concentração. Esta mistura não é desejada, no entanto para esta grandeza o efeito de mistura não é relevante.

6.2.2 Porosidade interparticular

A porosidade interparticular, ϵ_b , é uma fração entre o volume exterior às partículas de resina, volume interparticular e o volume total da coluna.

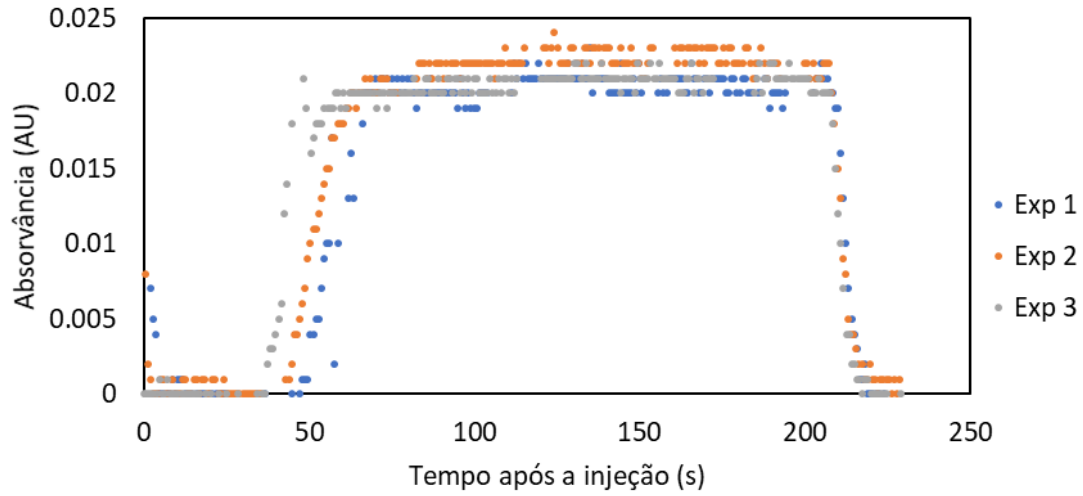


Figura 6.2: Absorvância da corrente de saída em função do tempo decorrido, após a injeção.

Tabela 6.1: Tempo de saída, caudal utilizado, volume morto do sistema e respetivo desvio padrão e erro dos resultados obtidos.

Experiência	$t_{saída}(s)$	Qv (mL/min)	V_{morto} (mL)	Desvio Padrão	Erro
1	57.784	0.5	0.482	0.034	8%
2	52.861		0.441		
3	47.315		0.397		
Média			0.440		

Para esta experiência, é necessário utilizar uma solução líquida em que o componente seja detetado por espectrofotometria e passe apenas pelo exterior das partículas, como é o caso do blue dextran [38]. Deste modo, o tempo que a solução demora a sair é devido ao volume morto, V_{morto} , e ao volume interparticular da coluna, $V_{interparticular}$.

Para efeitos de cromatografia, é boa prática utilizar uma solução com um solvente orgânico a, pelo menos, 5% (v/v). O composto orgânico escolhido foi o etanol, uma vez que é miscível com a água, não é retido numa coluna de fase reversa uma vez que é polar e exibe algumas características óticas para a análise por UV [39]. Deste modo, para estabelecer a referência, foi utilizada uma solução aquosa com 5% de etanol (v/v).

Recapitulando, o volume total do sistema, $V_{sistema}$, é composto pelo volume da coluna, V_{coluna} , e o volume morto, V_{morto} (que foi anteriormente calculado).

Quando é passada a solução de blue dextran na coluna, esta solução apenas ocupa o volume interparticular, $V_{interparticular}$.

É ainda de interesse relacionar o $V_{interparticular}$ com o volume total da coluna, V_{coluna} , de modo a conhecer a porosidade interparticular, ϵ_b .

Tabela 6.2: Condições de operação para as experiências de obtenção da porosidade interparticular.

Qv (mL/min)	V_{morto} (mL)	V_{coluna} (mL)
2.0	0.440	7.85

Tabela 6.3: Porosidade interparticular e análise probabilística dos resultados obtidos para a coluna 2

Experiência	t_{saida} (s)	Porosidade	Desvio Padrão	Erro
1	97.412	0.357	0.0117	3%
2	89.785	0.325		
3	94.563	0.397		
4	92.923	0.338		
Média		0.342		

$$V_{sistema} = V_{coluna} + V_{morto} \quad (6.5)$$

$$V_{coluna} = V_{interparticular} + V_{particulas\ na\ coluna} \quad (6.6)$$

É ainda de interesse relacionar o $V_{interparticular}$ com o volume total da coluna, V_{coluna} , de modo a conhecer a porosidade interparticular, ϵ_b .

$$V_{interparticular} = V_{coluna} \times \epsilon_b \quad (6.7)$$

Em termos experimentais são obtidos tempos e não volumes, pelo que os tempos obtidos são relacionados com o caudal, segundo a equação 6.1. Pela relação entre as equações 6.7 e 6.9 obtemos a equação 6.10, que é utilizada nos cálculos da porosidade interparticular. Uma vez que todas as variáveis são conhecidas ou calculadas à excepção da porosidade interparticular, esta será determinada pela relação abaixo estabelecida.

$$t_{injecao} - t_{saida} = \frac{V_{coluna} \times \epsilon_b + V_{morto}}{Qv} \quad (6.8)$$

As experiências foram realizadas de modo a determinar o tempo em que a solução demora a deixar o sistema, t_{saida} . Os resultados obtidos foram transpostos para os gráficos representados nas figuras 6.3 e 6.4, sendo que as condições operatórias estão explicitadas na tabela 6.2. Os resultados obtidos assim como a análise probabilística foram resumidos nas tabelas 6.3 e 6.4.

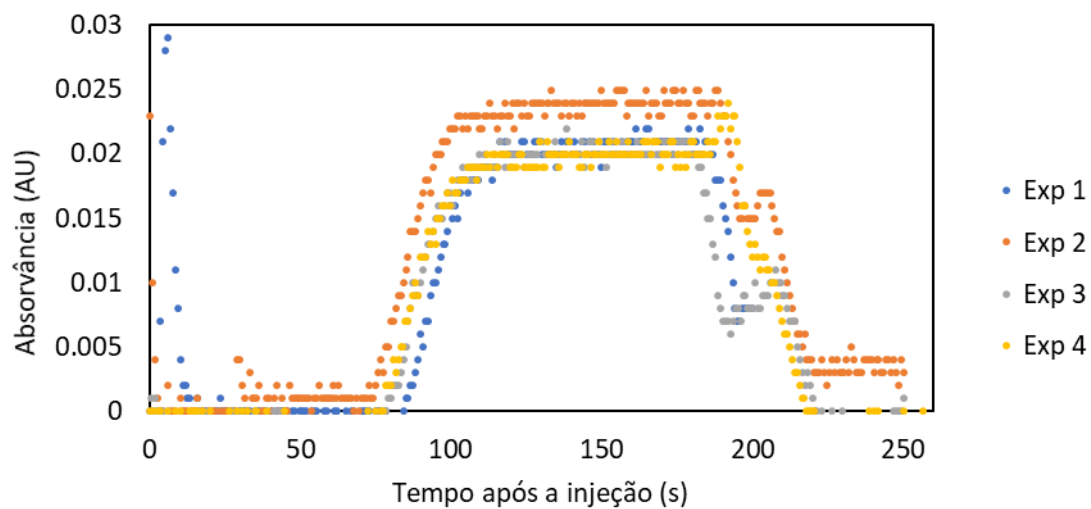


Figura 6.3: Absorvância da corrente de saída da coluna 2 em função do tempo decorrido após a injeção da solução aquosa de Blue Dextran.

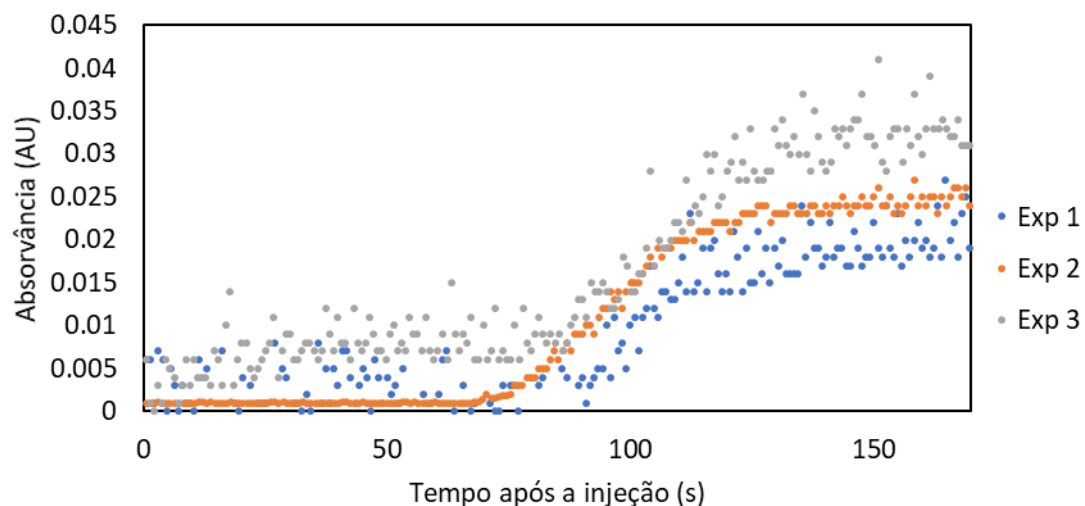


Figura 6.4: Absorvância da corrente de saída da coluna 3 em função do tempo decorrido após a injeção da solução aquosa de Blue Dextran.

Tabela 6.4: Porosidade interparticular e análise probabilística dos resultados obtidos para a coluna 3

Experiência	t_{saida} (s)	Porosidade	Desvio Padrão	Erro
1	100.4	0.370	0.0139	4%
2	101.2	0.374		
3	94.6	0.401		
Média		0.372		

Tabela 6.5: Condições de operação para as experiências de obtenção da porosidade total.

Qv (mL/min)	V _{morto} (mL)	V _{coluna} (mL)
2.0	0.440	7.85

Podemos inferir que seria de esperar que os resultados da porosidade externa fossem equivalentes para as duas colunas, no entanto observamos uma pequena discrepância. A porosidade da coluna 3 é 8% mais elevada que a da coluna 2. Para todos os resultados a porosidade da coluna 2 é inferior à da coluna 3.

6.2.3 Porosidade Total

Para calcular experimentalmente o volume dentro e fora das partículas, $V_{util\ da\ coluna}$, é necessário escolher um solvente que passe pelo interior dos poros da resina e que não seja retido.

Para efeitos de cálculo da porosidade total, ϵ , foi utilizada uma solução aquosa com 90% (v/v) etanol, na medida em que o diâmetro das moléculas de água e de etanol são inferiores ao diâmetro do poro. Não foi utilizado BD, que conferia melhores resultados, numa análise por espectrofotometria, uma vez que é uma solução corada. No entanto, tem um diâmetro de partícula superior ao diâmetro de poro.

De modo idêntico à experiência anterior, foi utilizada uma solução aquosa com 5% (v/v) de etanol para estabelecer a referência.

Adaptando as equações 6.10 e 6.9 referentes ao cálculo do volume interparticular, para o caso onde o líquido ocupa também o volume dentro das partículas e mantendo a mesma linha de pensamento, obtemos assim as equações 6.9 e 6.10.

$$V_{util\ da\ coluna} = V_{coluna} - V_{solido\ na\ coluna} = V_{coluna} \times \epsilon \quad (6.9)$$

$$t_{injecao} - t_{saida} = \frac{V_{coluna} \times \epsilon + V_{morto}}{Qv} \quad (6.10)$$

De modo similar, foram realizadas as experiências para a obtenção do tempo de saída da solução, T_{saida} , que foi calculado por EAM utilizando os dados obtidos. Os parâmetros de operação estão explícitos na tabela 6.5 e os resultados representados graficamente nos gráficos das imagens 6.5, para a coluna 2 e 6.6, para a coluna 3.

Os resultados obtidos, assim como a análise probabilística, foram resumidos nas tabelas 6.6 e 6.7.

Como foi referido anteriormente, uma solução corada apresentaria um sinal de absorvância mais fidedigno. No entanto, foi utilizada uma solução de etanol que não apresenta um sinal de absorvância muito forte, o que é uma possível explicação para a inexistência

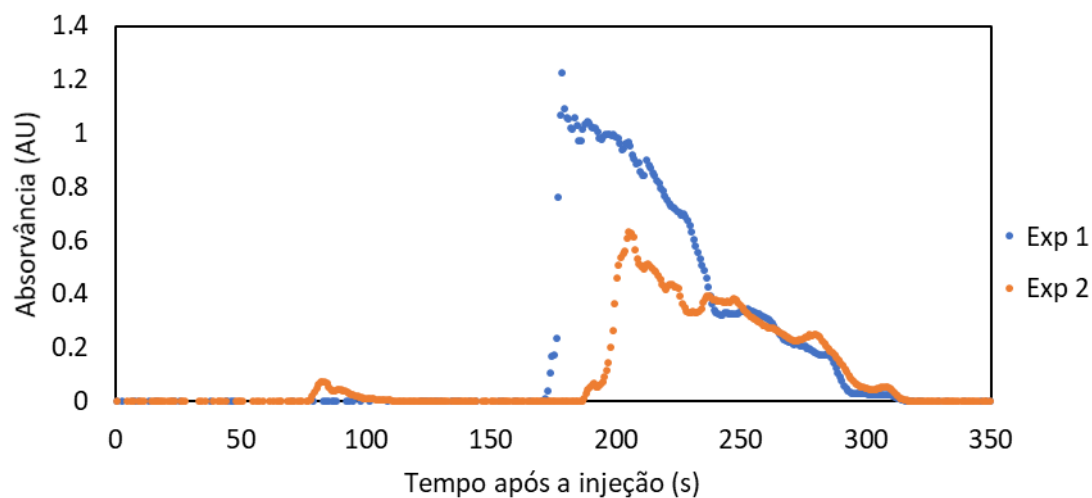


Figura 6.5: Absorvância da corrente de saída da coluna 2 em função do tempo decorrido após a injeção da solução aquosa contendo 90% de etanol.

Tabela 6.6: Resultados relativos à porosidade total da coluna 2 e respectiva análise probabilística

Experiência	t_{saida} (s)	Porosidade	Desvio Padrão	Erro
1	173.6	0.681	0.0584	8%
2	201.1	0.798		
Média		0.739		

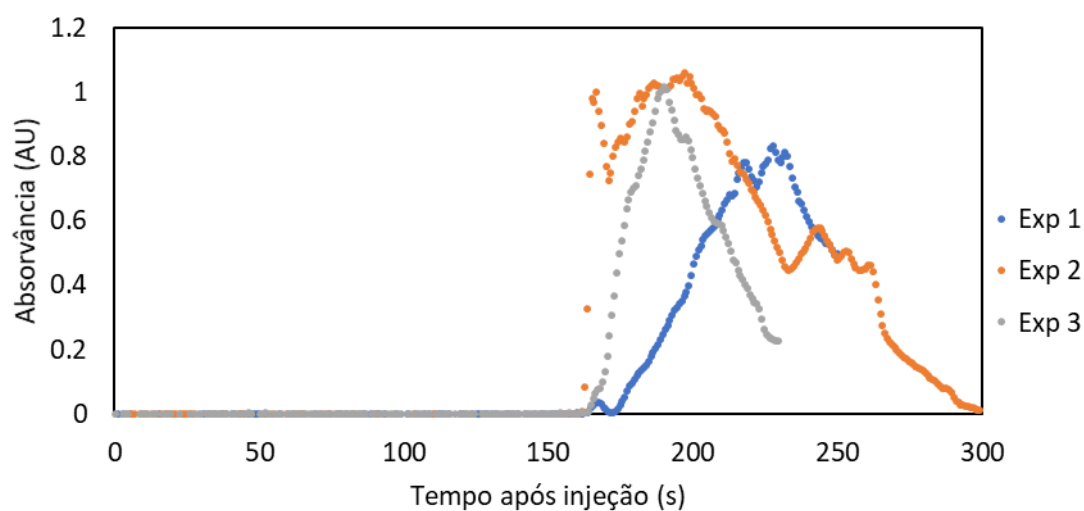


Figura 6.6: Absorvância da corrente de saída da coluna 3 conforme o tempo após a injeção da solução aquosa contendo 90% de etanol.

Tabela 6.7: Resultados relativos à porosidade total da coluna 3 e respetiva análise probabilística

Experiência	t_{saida} (s)	Porosidade	Desvio Padrão	Erro
1	195.3	0.773	0.0139	4%
2	180.6	0.711		
3	177.0	0.695		
Média		0.726		

de uma curva de rutura nos gráficos 6.5 e 6.6 assim como a falta de concordância entre a curva experimental e a curva teórica, sem patamares e pontos de inflexão.

Quanto ao valor obtido, é normal que a porosidade total seja maior que a porosidade externa, uma vez que as moléculas têm um maior trajeto. No entanto, estes valores são elevados relativamente ao esperado. Esta elevada discrepância entre porosidade externa e total demonstra a elevada porosidade das partículas e, conseqüentemente, a alta área superficial que é necessária para a obtenção de um elevado grau de separação.

A relação entre os valores de porosidade total, ϵ , e porosidade externa, ϵ_b , de modo a obter a porosidade da partícula, ϵ_p é dada pela equação 6.11.

$$\epsilon = \epsilon_b + (1 - \epsilon_b)\epsilon_p \quad (6.11)$$

É ainda possível obter o volume total das partículas, $V_{particula}$, (sólido+poros) e dos poros, V_{poros} , para ambas as colunas, apresentado na tabela através das relações apresentadas nas equações 6.12 e 6.13.

$$V_{particula} = V_{coluna} \times \epsilon_b \quad (6.12)$$

$$V_{poros} = V_{particulas} \times \epsilon_p \quad (6.13)$$

Na tabela 6.8 estão apresentados os resultados obtidos após a análise das porosidades obtidas.

6.3 Isotérmicas

Foram usados dois compostos para a determinação das suas isotérmicas. Os compostos utilizados foram a Guanosina e a Uridina.

De modo a perceber a concentração máxima a utilizar, foram realizados testes de solubilidade do composto, no solvente utilizado (5% etanol). A concentração máxima alimentada ao sistema cromatográfico deve ser inferior à concentração máxima de solubilidade, sendo que foi utilizado 80% deste valor. Para condições de pressão e temperatura

Tabela 6.8: Volume das partículas e dos poros para as duas colunas, tendo por base o cálculo das porosidade interna e externa assim como o valor conhecido do volume da coluna

Coluna	Volume (mL)	
	Partículas	Poros
2	2.683	1.621
3	2.920	1.648

Tabela 6.9: Concentrações utilizadas de Guanosina e Uridina

Concentração (g/L)	
Uridina	Guanosina
33.683	0.473
29.940	0.426
26.198	0.378
22.45	0.331
18.713	0.280
14.970	0.237
11.228	0.189
7.485	0.142
3.743	0.095
	0.047

diferentes das experimentais, os compostos podem precipitar, adicionalmente é possível que a concentração do composto não seja constante em todo o seu volume, pelo que em algumas partes da solução a concentração pode ser superior à concentração máxima de solubilidade. É ainda de referir que a concentração da solução alimentada foi feita a partir da mistura de uma solução-mãe, com uma elevada concentração do produto-alvo e uma solução aquosa de 5% de etanol. Na tabela 6.9 estão representadas as concentrações utilizadas tanto de Guanosina como de Uridina.

De modo a estabelecer uma relação que nos permita calcular a constante de isotérmica, é necessário realizar o balanço mássico descrito na equação 6.14

$$m_{injetada} - m_{removida} = m_{0,sistema} + m_{intraparticular} + m_{adsorvida} \quad (6.14)$$

Em que $m_{removida}$ é a massa que sai do sistema, ou seja, por um lado temos a massa que entra no sistema e por outro a massa que sai do sistema. A massa que fica retida no volume morto é $m_{0,sistema}$ e a massa que fica retida na partícula é a massa adsorvida,

$m_{adsorvida}$.

É necessário ainda passar os termos da equação anterior para uma forma explícita, de modo a calculá-los com os dados experimentais obtidos e as condições operatórias utilizadas. Estas relações estão representadas nas equações 6.15 a 6.18

$$m_{injetada} = t_{injecao} \times Qv \times c_i \quad (6.15)$$

$$m_{removida} = (t_{inicio\ de\ saida} - t_{fim\ de\ saida}) \times Qv \times c_i \quad (6.16)$$

$$m_{0,sistema} = V_{morto} \times C_i \quad (6.17)$$

$$m_{intraparticular} = V_{coluna} \times \epsilon \times C_i \quad (6.18)$$

$$(6.19)$$

Em que o tempo de injeção, $t_{injecao}$, está indicado no ficheiro de monitorização, o caudal volumétrico, Qv , é definido e o volume da coluna, V_{coluna} , é conhecido. O $t_{injecao}$ foi considerado nulo, uma vez que serviu de referencia para o começo da experiência. Adicionalmente, o tempo de início de saída é calculado pelo EAM da primeira curva e o tempo de fim de saída é calculado utilizando o mesmo método para a segunda curva do gráfico das concentrações ao longo do tempo, relativamente ao patamar (concentração) a ser analisada.

No entanto, é benéfico passar os dados recolhidos sob a forma de absorvâncias para concentrações, recorrendo a uma reta de calibração obtida entre a concentração alimentada e a média das absorvâncias obtidas.

Depois de obtidos os resultados de massa acumulada, $m_{acumulada}$, é necessário passá-los para massa adsorvida por volume de sólido, quando é atingido o equilíbrio, q^* . O valor de q^* é obtido utilizando a equação 6.20.

$$q^* = \frac{m_{acumulada}}{V_{slido}} = \frac{m_{acumulada}}{V_{coluna} \times \epsilon_b} \quad (6.20)$$

Um dos possíveis métodos experimentais, é o método das escadas, em que a injeção é feita em contínuo, sendo que, em intervalos de tempo estipulados a solução injetada muda de concentração, sendo que a nova concentração é superior à anterior. Deste modo, é apenas necessária uma experiência global, pelo que é aproveitada a massa adsorvida entre passos. A massa total acumulada na partícula, $M_{acumulada,c_j}$, é dada pela equação 6.21.

$$M_{acumulada, c_j} = \sum_{i=1}^{Nc} M_{adsorvida, c_i} \quad (6.21)$$

6.3.1 Guanosina

Abaixo estão representados os resultados experimentais e os resultados após o tratamento dos dados obtidos para a experiência utilizando a Guanosina.

Tabela 6.10: Condições de operação para as experiências de obtenção da isotérmica da Guanosina. O volume morto não é o mesmo utilizado nas experiências anteriores, uma vez que foi necessário modificar o sistema, tendo sido realizadas novas experiências para determinar o novo volume morto.

Qv (mL/min)	V_{morto} (mL)	V_{coluna} (mL)	$t_{injecao}$ (s)	Porosidade
2.0	0.356	7.854	270	0.342

Tabela 6.11: Índices da equação polinomial, de segundo grau, que define a reta de Calibração da Guanosina. Cada linha corresponde ao valor obtido para a respectiva experiência realizada

Experiência	x^2	x
1	0.212	0.882
2	0.191	0.901
3	0.242	0.867

Na tabela 6.10 estão explicitados os parâmetros operatórios utilizados e os dados conhecidos, antes da experiência, necessários para o cálculo das isotérmicas. Adicionalmente, na Tabela 6.11 estão explicitados os coeficientes da função que descreve a reta de calibração, ou seja, a função que permite passar as absorvâncias para concentrações.

No gráfico da figura 6.7 estão representados os dados obtidos experimentalmente, ou seja, a concentração (posteriormente foi passada a absorvância para concentração) obtida em função do tempo após a injeção. Os dados obtidos, relativamente ao tempo de saída para as várias concentrações alimentadas e para as 3 experiências realizadas, estão identificados na tabela 6.12.

Por fim, na Tabela 6.13 estão apresentados os dados calculados, referente às constantes de isotérmica, $q^*(g_{Guanosina}/L_{solido})$, para as 3 experiências (colunas) e para as várias concentrações (linhas), assim como a respectiva análise probabilística referente aos dados das 3 experiências. Estes dados foram transpostos para o gráfico da figura 6.8, que corresponde ao gráfico da isotérmica da Guanosina. Com base no gráfico obtido, foi verificada uma linearidade entre os pontos obtidos, esta linha de tendência está representada no mesmo gráfico, assim como os valores do declive, o declive da reta permite calcular a constante de Henry para a Guanosina em relação ao enchimento, como vamos ver mais à frente na subsecção 6.3.3

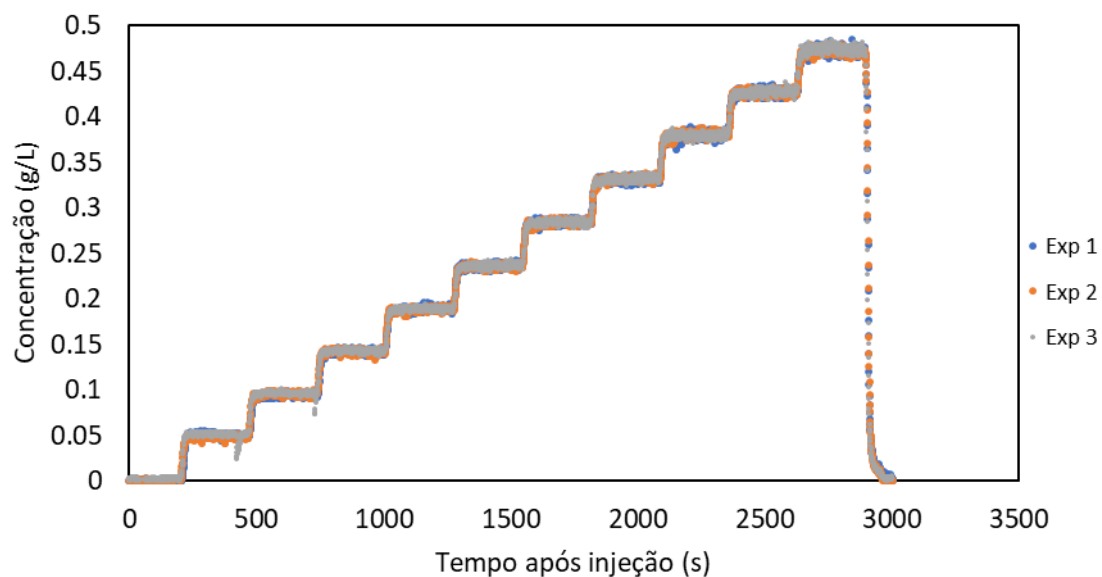


Figura 6.7: Concentração da corrente de saída contendo Guanosina a diferentes concentrações em função do tempo após a injeção.

Tabela 6.12: Tempos médios de residência do composto no sistema, dependendo da concentração alimentada de Guanosina para as várias experiências.

Concentração (g/L)	Experiência		
	1	2	3
0.05	216.00	207.45	211.41
0.09	480.42	477.08	479.05
0.14	748.94	746.50	748.28
0.19	1015.64	1013.92	1017.19
0.24	1284.00	1284.19	1287.14
0.28	1553.92	1553.39	1557.70
0.33	1824.97	1825.05	1823.84
0.38	2093.92	2095.27	2095.05
0.43	2365.77	2365.23	2365.05
0.47	2633.46	2634.58	2634.02

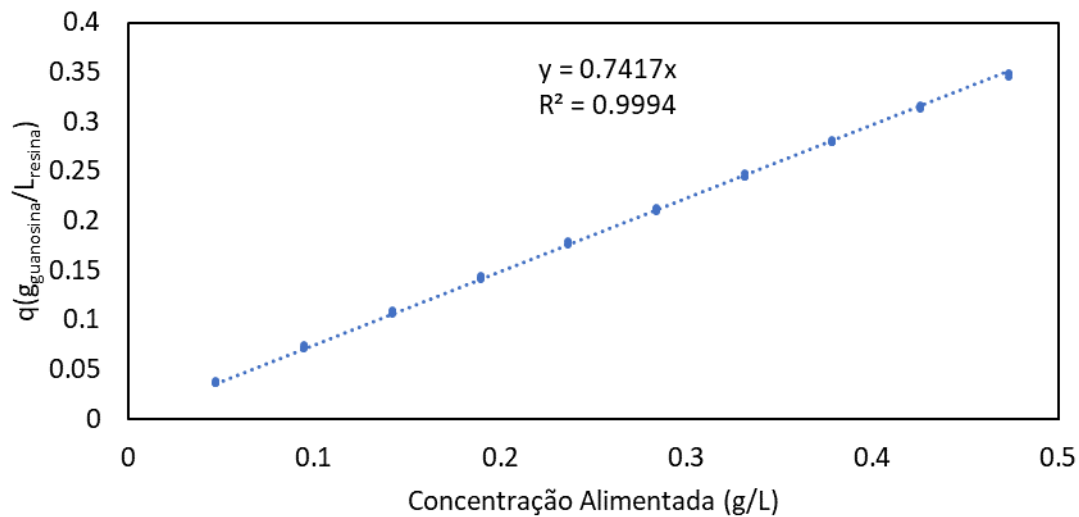


Figura 6.8: Isotérmica da Guanosina. Massa adsorvida por volume de sólido a várias concentrações.

Tabela 6.13: Resultados dos valores da constante de isotérmica, $q^*(g_{\text{Guanosina}}/L_{\text{sólido}})$ dependendo da concentração de Guanosina alimentada e consequente análise probabilística.

Concentração (g/L)	Experiência			Média	Desvio Padrão	Erro
	1	2	3			
0.0473	0.0382	0.0356	0.0366	0.0368	0.0011	0.0286
0.0946	0.0745	0.0711	0.0724	0.0727	0.0014	0.0194
0.1419	0.1104	0.1063	0.1076	0.1081	0.0017	0.0155
0.1892	0.1452	0.1408	0.1423	0.1428	0.0018	0.0125
0.2365	0.1794	0.1754	0.1768	0.1772	0.0016	0.0092
0.2838	0.2136	0.2098	0.2115	0.2116	0.0016	0.0073
0.3311	0.2479	0.2446	0.2450	0.2458	0.0015	0.0061
0.3784	0.2818	0.2795	0.2788	0.2800	0.0013	0.0046
0.4257	0.3162	0.3144	0.3125	0.3144	0.0015	0.0048
0.4730	0.3498	0.3491	0.3457	0.3482	0.0018	0.0051

Tabela 6.14: Condições de operação para as experiências de obtenção da isotérmica da Uridina.

Experiência	Qv (mL/min)	V_{morto} (mL)	V_{coluna} (mL)	$t_{injecao}$ (s)	Porosidade
1	2.0	0.356	7.854	105	0.342
2				180	
3				150	

Tabela 6.15: Na seguinte tabela estão identificados os parâmetros adjacente à reta de calibração da Uridina. Cada linha corresponde ao valor obtido para a respectiva experiência realizada. Para a primeira experiência foi obtida uma reta de calibração bastante diferente das restantes devido ao comprimento de onda utilizado, deste modo é explicitado os comprimentos de onda utilizados.

Experiência	x^3	x^2	x	Comprimento de onda (nm)
1	9.4571	7.8727	15.208	295.03
2			87.939	299.84
3			84.492	299.84

6.3.2 Uridina

A experiência para a obtenção da isotérmica da Uridina, foi realizada de modo análogo ao utilizado e anteriormente explicado, para a Guanosina.

Abaixo estão representados os resultados experimentais e os resultados após o tratamento dos dados para a Uridina. Na tabela 6.14 estão explicitados os parâmetros de operação e algumas características relevantes do sistema e da coluna. Relativamente à passagem das absorvâncias obtidas para concentrações, estão identificados os parâmetros da reta de calibração na tabela 6.15. Entretanto, a passagem de absorvâncias para concentrações foi realizada, pelo que os resultados de concentração em função da concentração estão compilados no gráfico da figura 6.9. Os dados relativos ao tempos médios de saída do composto estão representados na tabela 6.16. Por último, os dados referentes à isotérmica estão apresentados na tabela 6.17 e representados graficamente na imagem 6.10.

6.3.3 Comparação e discussão

Através da análise dos dados obtidos, referentes às isotérmicas da Guanosina e da Uridina, podemos afirmar que a relação entre q^* e c , é linear para a gama de concentração testada. A linearidade da isotérmica facilita os cálculos, uma vez que a isotérmica apenas varia com

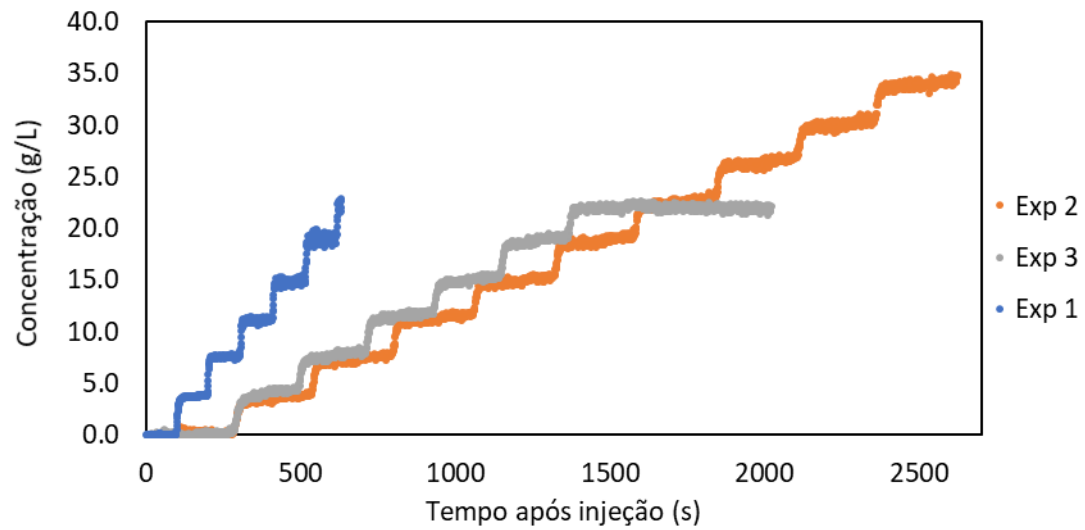


Figura 6.9: Concentração da corrente de saída contendo Uridina a diferentes concentrações em função do tempo após a injeção.

Tabela 6.16: Tempos médios de saída dependendo da concentração alimentada de Uridina para as várias experiências.

Concentração (g/L)	Experiência		
	1	2	3
3.74	101.31	200.72	200.50
7.49	201.02	369.81	342.50
11.23	306.30	549.84	490.09
14.97	411.95	728.69	638.44
18.71	516.47	908.81	787.81
22.46	622.36	1264.31	936.63
26.20		1444.38	
29.94		1622.44	
33.68		1798.81	

Tabela 6.17: Resultados dos valores da constante de isotérmica, $q^*(g_{Uridina}/L_{solido})$ determinada para cada experiência, dependendo da concentração de Guanosina alimentada e consequente análise probabilística.

Concentração (g/L)	Experiência			Média	Desvio Padrão	Erro
	1	2	3			
3.743	2.689	2.643	2.630	2.654	0.025	0.010
7.485	5.119	5.029	5.066	5.071	0.037	0.007
11.228	7.556	7.405	7.442	7.468	0.064	0.009
14.970	10.011	9.752	9.774	9.845	0.117	0.012
18.713	12.427	12.102	12.090	12.206	0.156	0.013
22.455	14.876	18.684	14.377	14.626	0.250	0.017
26.198		25.264		25.264		
29.940		31.793		31.793		
33.683		41.890		41.890		

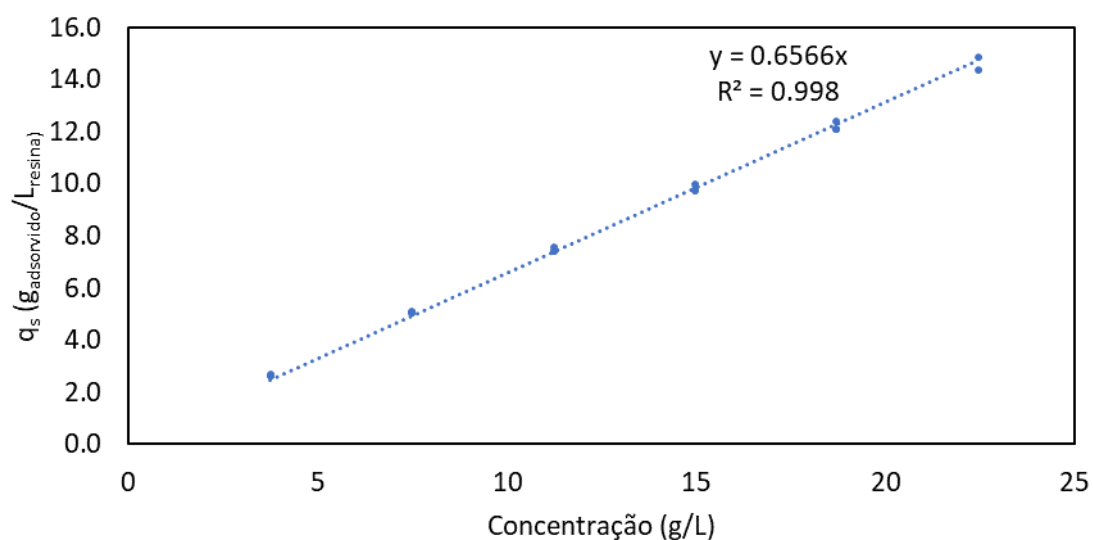


Figura 6.10: Isotérmica da Uridina. Massa adsorvida por volume de sólido a várias concentrações.

Tabela 6.18: Resultados da constante de henry para os compostos analisados.

	Guanosina	Uridina
H	0.742	0.657

a concentração de solvente, sendo que a constante de Henry volumétrica, H , é constante em toda a gama de concentrações analisada. Especialmente quando estamos a falar em validar sistemas novos, misturas de compostos cujas isotérmicas são lineares são a forma mais simples de proceder à devida análise. Para isotérmicas lineares, a absorvância total é igual à soma das absorvâncias dos compostos 1 e 2.

Através dos gráficos obtidos de q^* em função de c , é possível obter a constante de henry, H . Se a relação entre q^* e c for linear a equação 6.22 descreve a relação entre as variáveis de modo a calcular a constante de henry.

$$q^* = H \times c \quad (6.22)$$

Na tabela 6.18 são apresentadas as constantes de henry determinadas para os dois compostos.

6.4 Bomba não isocrática

De modo a perceber o nível de mistura da bomba de gradiente utilizada, foram realizados dois tipos de experiência em que a solução proveniente da bomba passou pelos: (1) Capilares, sem coluna; (2) capilares e coluna.

Na primeira experiência, apresentada no gráfico 6.11, foram testados tempos de injeção de 30 segundos, 3 minutos e 10 minutos utilizando um caudal de 2.0 mL/min. No tempo de injeção estabelecido, é realizada a variação da concentração de uma forma contínua, começando com 0% de volume da solução de BD e 100% de volume de água e acabando com 100% de volume da solução de BD e 0% da solução de água.

Vemos que se nota uma oscilação. Esta oscilação no cromatograma é devida ao gradiente, pois é injetado BD e só depois água, sendo que esta injeção devia ter uma duração mais reduzida, de modo a serem misturados quase continuamente. Podemos concluir que a bomba não realiza um gradiente satisfatório, utilizando intervalos de tempo de mistura para o qual se nota a diferença de composição da mesma.

No entanto, a frente de concentração pode ser suavizada aquando da passagem da solução pela coluna, uma vez que o volume é maior e os fatores que possivelmente promovem a mistura são consideráveis, como o atrito entre o líquido, as extremidades da coluna e a própria resina. Por outro lado, na entrada da coluna existe uma câmara que promove a distribuição do líquido e pode também ser um fator que promove a mistura da

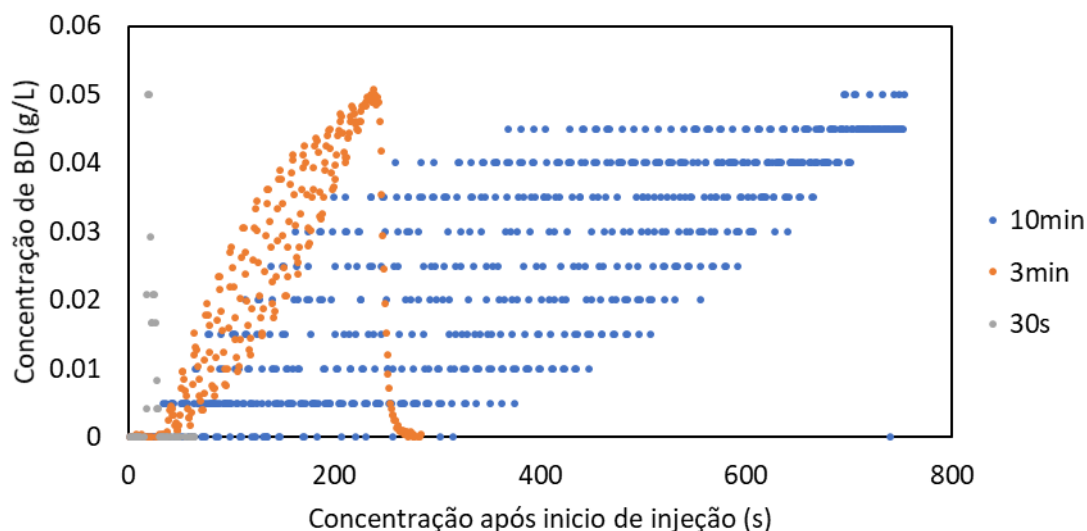


Figura 6.11: Absorvância em função do tempo de injeção. Em que é realizado um gradiente de concentração e a solução passa apenas pelos capilares.

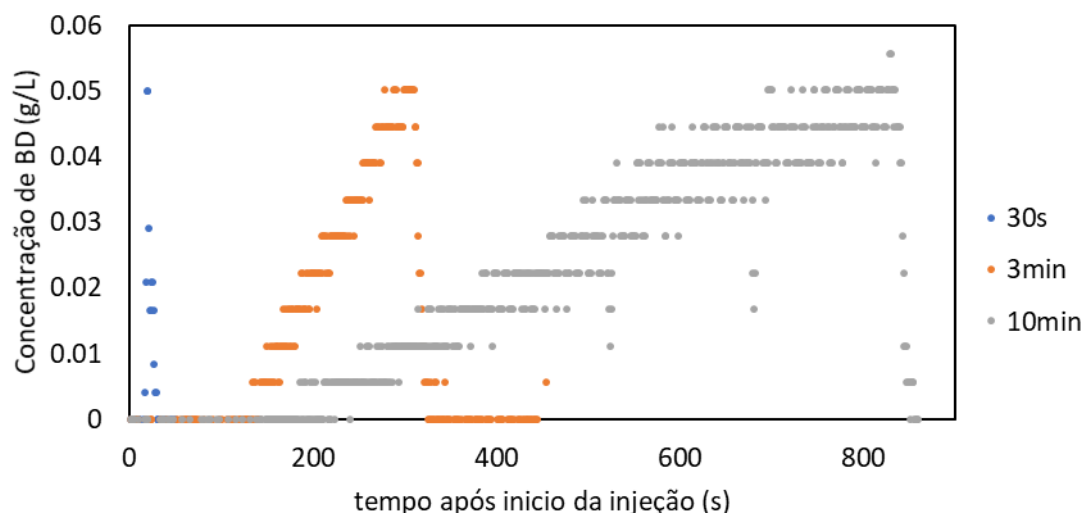


Figura 6.12: Absorvância em função do tempo de injeção. Foi realizado um gradiente de concentração e a solução passou pelos capilares e pela coluna.

solução. Foi, portanto, realizada a mesma experiência de injeção da solução recorrendo a um gradiente de concentração de BD, perante as mesmas condições de caudal e tempo de injeção, relativamente à experiência anterior. Os dados obtidos estão representados no gráfico da figura 6.12.

Podemos observar que as frentes de concentração são, de facto, amenizadas e o gradiente, embora com a existência de patamares de concentração, é suavizado. No entanto, quando a bomba for utilizada no sistema completo, o volume morto é superior aquele existente nas experiências realizadas, pelo que existe a mistura da solução.

Uma possível solução para a realização de gradientes mais preciso é a utilização de

duas bombas distintas que fornecem a fração de volume necessária para a mistura total. No entanto, esta alternativa representa um maior custo inicial do sistema. Outra solução possível seria a aquisição de uma câmara de mistura para a bomba de gradiente.

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Ao longo deste trabalho, procedeu-se à caracterização das colunas, sendo que a porosidade interna foi de 0.739 e 0.726 e a porosidade externa foi de 0.342 e 0.372, relativamente à coluna 2 e 3, respetivamente.

Foram também determinadas as isotérmicas, ou seja, o comportamento de adsorção exibido por parte da Uridina e da Guanosina face ao enchimento presente na coluna de fase reversa utilizada, cujo enchimento é um C18. Foi verificada uma isotérmica linear em que a constante de henry volumétrica, H , em que os valores obtidos foram de 0.742 para a Guanosina e 0.657 para a Uridina.

Adicionalmente, foi realizado o *case study* do processo de GSSR, utilizando o código desenvolvido. Este *case study* foi bem sucedido, uma vez que os resultados obtidos e aqueles apresentados no artigo foram semelhantes. Foi obtida uma pureza de 98.3 e uma taxa de recuperação de 99.4.

O trabalho realizado foi apenas uma parte inicial do sistema pretendido, sendo que há múltiplas tarefas a serem realizadas futuramente, de modo a completar o sistema.

- Primeiramente é necessária uma melhoria na **disposição do sistema**, reduzindo o volume morto.
- Seguidamente é também necessário planear e realizar uma **validação experimental** do sistema com compostos de composição conhecida, como é o caso da Uridina e da Guanosina que, adicionalmente, são compostos de relativa fácil obtenção.
- Adicionalmente, é necessária a análise dos compostos isolados, que estão presentes no *crude mix*, de forma a **obter os valores da cinéticas de adsorção dos vários compostos**.

- Por último, mas com maior relevância, é necessário fazer uma **otimização precisa de modo a conhecer os parâmetros de operação**, ou seja, os tempos de operação, os caudais utilizados, a pureza, o recuperação, o número de colunas a utilizar, e a calendarização do processo em termos das correntes de entrada e o destino das correntes de saída.

Um objetivo mais ambicioso seria a elaboração de um sistema que contemplasse tanto a separação como a própria produção de peptídeos. No entanto, a etapa de produção teria uma alta componente de química pura, pelo que é um tema muito díspar daquele abordado aquando da separação. Adicionalmente, é um trabalho demorado e para o qual é necessária uma grande componente de investigação, uma vez que é um processo pouco estudado e, consequentemente, com pouca informação disponível.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Z. M. Research. *Peptide Therapeutics Market*. 2018. URL: <https://www.globenewswire.com/news-release/2018/10/22/1624591/0/en/Peptide-Therapeutics-Market-Will-Reach-USD-43-26-Billion-By-2024-Globally-Zion-Market-Research.html>.
- [2] S. Sachdeva. "Peptides as 'Drugs': The Journey so Far". Em: *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 23.1 (2017), pp. 49–60. ISSN: 1573-3904. DOI: 10.1007/s10989-016-9534-8. URL: <https://doi.org/10.1007/s10989-016-9534-8>.
- [3] *Developing the Tools to Evaluate Complex Drug Products: Peptides*. URL: <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ucm578111.htm>.
- [4] S. S. Usmani, G. Bedi, J. S. Samuel, S. Singh, S. Kalra, P. Kumar, A. A. Ahuja, M. Sharma, A. Gautam e G. P. S. Raghava. "THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics". Em: *PLOS ONE* 12.7 (jul. de 2017), pp. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0181748. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181748>.
- [5] M. Mikulic. *Global Pharmaceutical Industry - Statistics Facts*. 2019. URL: <https://www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry/> (acedido em 30/09/2010).
- [6] W. Pytlik. "Healthcare industry". Em: *The growing significance of peptide therapeutics* (2014). URL: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/the-growing-significance-of-peptide-therapeutics>.
- [7] J. L. Lau e M. K. Dunn. "Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions". Em: *Bioorganic Medicinal Chemistry* 26.10 (2018). Peptide Therapeutics, pp. 2700–2707. ISSN: 0968-0896. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089617310222>.
- [8] C. D. Schteingart e J. L. Lau. "Chapter Fifteen - From Natural Peptides to Market". Em: *Platform Technologies in Drug Discovery and Validation*. Ed. por R. A. Goodnow. Vol. 50. Annual Reports in Medicinal Chemistry. Academic Press, 2017, pp. 543–586. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.003>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774317300064>.

- [9] J. M. Palomo. "Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides". Em: *RSC Adv.* 4 (62 2014), pp. 32658–32672. DOI: 10.1039/C4RA02458C. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA02458C>.
- [10] V. Glaser. "Strategies for Optimizing Peptide Synthesis". Em: *Genetic Engineering Biotechnology News* 31 (13 2011). URL: <https://www.genengnews.com/magazine/162/strategies-for-optimizing-peptide-synthesis/>.
- [11] *Peptide Synthesis*. URL: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/peptide-synthesis.html>.
- [12] *Peptide synthesis*. 2019. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_synthesis#/media/File:Solid-phase_peptide_synthesis_\(SPPS\).svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_synthesis#/media/File:Solid-phase_peptide_synthesis_(SPPS).svg).
- [13] *Downstream Process (DSP) - What is it?* 2018. URL: <https://esiultrapure.com/downstream-process/>.
- [14] R. Freitag e J. Breier. "Displacement chromatography in biotechnological downstream processing." Em: *Journal of Chromatography A* 1-2 (691 1995), pp. 101–112. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/%2fbfb0102324.pdf>.
- [15] J. Gurdon, S. Dyson e D. St Johnston. *Cells' Perception of Position in a Concentration Gradient*. 1998. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740081747X?via%3DiHub> (acedido em 30/09/2010).
- [16] C. for Drug Evaluation e Research. *Developing the Tools to Evaluate Complex Drug Products: Peptides*. URL: <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ucm578111.htm>.
- [17] *Custom Affinity Chromatography Service*. URL: <https://www.creative-biostructure.com/custom-affinity-chromatography-service-257.htm>.
- [18] C. O. "Separation techniques: Chromatography". Em: *Northern clinics of Istanbul* 3 (2 2016), 156–160. DOI: 10.14744/nci.2016.32757.
- [19] *Reversed phase chromatography*. 1999. URL: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/pdf/reversephase/amershamrpcmanual.pdf>.
- [20] *Continuous chromatography in downstream processing of a monoclonal antibody*. URL: https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/AKTApccAN_1.PDF.
- [21] *Benefits of automated protein purification*. URL: <https://www.gelifesciences.com/en/us/news-center/benefits-of-automated-protein-purification-10001>.
- [22] A. Rodrigues, C. Pereira, M. Minceva, L. Pais, A. Ribeiro, M. Silva, N. Graça e J. Santos. "Principles of Simulated Moving Bed". Em: *Simulated moving bed technology*. Reading, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2015. Cap. 1.

- [23] G. Guiochon, A. Felinger, D. Shirazi e A Katti. "Simulated Moving Bed Chromatography". Em: *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. 2nd. Reading, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2006. Cap. 17.
- [24] R Silva. "Compact simulated countercurrent chromatography for downstream processing of (bio)pharmaceuticals". Tese de doutoramento. Faculdade de Ciencias e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [25] D. B. Broughton e C. G. Gerhold. *Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets*. US Patent 2,985,589. 1957. URL: <https://patents.google.com/patent/US2985589A/en>.
- [26] J. Hur e P. Wankat. "New Design of Simulated Moving Bed (SMB) for Ternary Separations". Em: *Industrial Engineering Chemistry Research* 44.6 (2005), pp. 1906–1913.
- [27] L. Aumann e M. Morbidelli. "A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process." Em: *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 44.6 (2007), pp. 728–733.
- [28] S. Sachdeva. "Peptides as 'Drugs': The Journey so Far". Em: *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 98.5 (2007), pp. 1043–1055.
- [29] U. Wenzel e Ullrich. "Twin column chromatography for industrial-scale decontamination processes". Em: *Journal of Chromatography A* 1023.2 (2004), pp. 207–213.
- [30] Chromacon. *Continuous chromatography for polishing processes: MCSGP*. URL: <https://www.chromacon.com/en/technology/continuous-polishing-processes-mcsgp> (acedido em 30/09/2010).
- [31] L. Aumann, M. Morbidelli, B. Schenkel e G Stroehlein. "A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process". Em: *BioPharma* 22.1 (2009). URL: <http://www.biopharminternational.com/protein-peptide-purification-using-multicolumn-countercurrent-solvent-gradient-purification-mcsgp-pr?id=&sk=&date=&pageID=2> (acedido em 30/09/2010).
- [32] R. Silva, R. Rodrigues, H. Osuna-Sanchez, M. Bailly, E. Valéry e J. Mota. "A new multicolumn, open-loop process for center-cut separation by solvent-gradient chromatography". Em: *Journal of Chromatography A* 1217.52 (2010), pp. 8257–8269.
- [33] Kromasil. *The perfectly shaped silica*. URL: https://www.kromasil.com/products/classic/the_silica.php (acedido em 30/09/2010).
- [34] Justchromatography. *Endcapping*. URL: <http://www.justchromatography.com/wiki/endcapping> (acedido em 30/09/2010).
- [35] H Fogler. *Elements of Chemical Reaction Engineering*, 5th ed. Prentice Hall, 2016. Cap. 3.

- [36] F. A.S. D. Guiochon G. e A Katti. "Simulated Moving Bed Chromatography". Em: *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. 2nd. Reading, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2006. Cap. 2.
- [37] Y Artioli. *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, 2008. Cap. Adsorption.
- [38] *blue dextran - an overview*. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/blue-dextran> (acedido em 30/09/2010).
- [39] *Reversed Phase Mobile Phase Solvents*.
- [40] B. L. Nilsson, M. B. Soellner e R. T. Raines. "Chemical synthesis of proteins". Em: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34 (2005), 91–118. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700>. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845543/>.
- [41] G. Guiochon, A. Felinger, D. Shirazi e A Katti. "Simulated Moving Bed Chromatography". Em: *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. 2nd. Reading, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2006. Cap. 3.
- [42] E. R. Z. Melander W. e C. Horváth. "). Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography". Em: *Journal of Chromatography A* 469 (1989), pp. 3–27.